

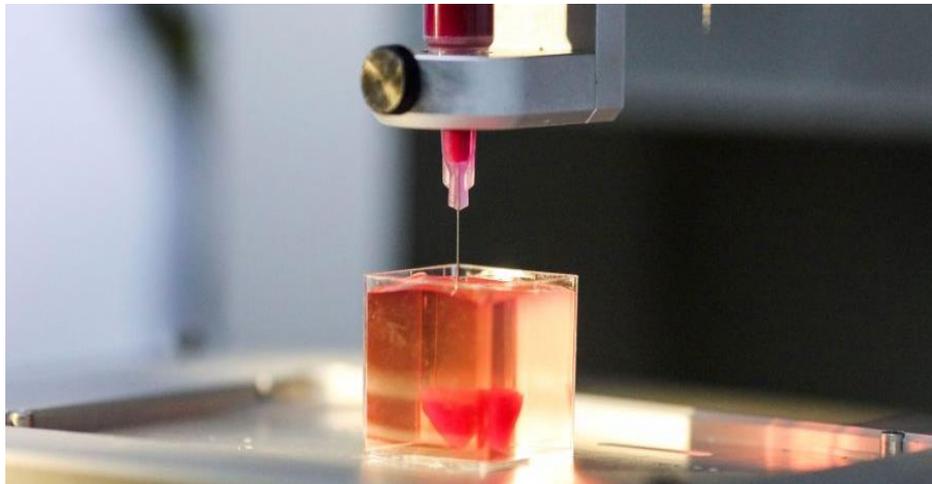
Grao en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

Revisión bibliográfica: Fabricación de órganos artificiais

Revisión bibliográfica: Fabricación de órganos artificiais

Literature review: Artificial organs manufacture



Andrea Estefania Pereira Cuns

Curso: 2021-2022. Convocatoria: Junio

Director: Antonio M. Castro Castro

ÍNDICE

Resumen / Resumo / Abstract	3
Palabras clave / Palabras chave / Keywords	3
1. Introducción	4
2. Objetivo.....	5
3. Material y métodos	5
4. Resultados y Discusión.....	6
4.1. Ingeniería de Tejidos	6
4.1.1. Biomateriales y andamio/"scaffold"	7
4.1.2. Células	8
4.1.3. Señales.....	10
4.2. Fabricación de tejidos y órganos	10
4.3. Avances particulares en la producción de diferentes tejidos y órganos	12
4.3.1. Producción de órganos/tejidos.....	12
4.3.2. Ensayos en animales	13
4.3.3. Experiencias en humanos	14
5. Bioimpresión 3D: perspectivas de futuro	15
5.1. Extrusión	17
5.2. Inkjet	17
5.3. Láser	17
6. Conclusiones / Conclusións / Conclusions.....	18
7. Bibliografía	20

RESUMEN

La fabricación de órganos y tejidos artificiales surge a consecuencia de la falta de donantes para suplir la demanda de órganos. El diseño de órganos y tejidos artificiales a medida permitirá adecuar dichos órganos al sistema inmune de cada paciente, evitando los inconvenientes de los tratamientos con inmunosupresores. De esa premisa surge un campo de investigación interdisciplinar denominado Ingeniería de Tejidos, cuyas áreas de investigación se centran en las células, los biomateriales y las señales. En este trabajo se realizará una aproximación bibliográfica a los progresos científicos de los últimos años que han permitido a los investigadores avanzar en el diseño y producción de órganos artificiales. Aunque todavía no se ha logrado fabricar de manera estandarizada ningún órgano completo viable, serán los avances tecnológicos como las impresoras 3D los que permitirán en un futuro la fabricación de órganos complejos funcionales.

Palabras clave: Ingeniería de Tejidos, órganos artificiales, tejidos artificiales, órganos sintéticos, bioimpresión 3D, trasplantes, biomedicina.

RESUMO

A fabricación de órganos e tecidos artificiais surge como consecuencia da falta de doantes para suplir a demanda de órganos. O deseño de órganos e tecidos artificiais a medida permitirá adecuar devanditos órganos ao sistema inmune de cada paciente, evitando os inconvenientes dos tratamentos con inmunosupresores. Desda premisa surge un campo de investigación interdisciplinar denominado Enxeñería de tecidos, cuxas áreas de investigación céntranse nas células, os biomateriais e os sinais. Neste traballo realizarase unha aproximación bibliográfica aos progresos científicos dos últimos anos que permitiron aos investigadores avanzar no deseño e produción de órganos artificiais. Aínda que non se logrou fabricar de maneira estandarizada ningún órgano completo viable, serán os avances tecnolóxicos como as impresoras 3D os que permitirán nun futuro a fabricación de órganos complexos funcionais.

Palabras chave: Enxeñería de tecidos, órganos artificiais, tecidos artificiais, órganos sintéticos, bioimpresión 3D, transplantes, biomedicina.

ABSTRACT

The manufacture of artificial organs and tissues arises to supply the lack of organ donors. The design of personalized artificial organs and tissues will allow these organs to be adapted to the immune system of each patient, avoiding the inconveniences of immunosuppressant treatments. Based on this premise arises an interdisciplinary research field called Tissue Engineering, whose research areas focus on cells, biomaterials and signals. In this work, a bibliographic approach will be made to the scientific progress of recent years that has allowed researchers to advance in the design and production of artificial organs. Although no viable complete organ has yet been manufactured in a standardized way, it will be technological advances such as 3D printers that will allow the manufacture of complex functional organs in the future.

Keywords: Tissue engineering, artificial organs, artificial tissues, synthetic organs, 3D bioprinting, transplants, biomedicine.

1. INTRODUCCIÓN

Cuando se sufren enfermedades debidas al mal funcionamiento de los órganos, de manera congénita o adquirida, o estos presentan lesiones y no cumplen su función correctamente, hasta hace no mucho tiempo las alternativas eran pocas y, dependiendo del órgano dañado o alterado, se podía recurrir al trasplante o al uso de prótesis para tratar de solucionarlo.

Ya en el antiguo Egipto se empleaban prótesis, como piezas bucales o incluso la prótesis de un dedo gordo del pie que suplía parcialmente la función de uno natural; lo que nos da a entender que no era solo por la creencia de los egipcios de que el cuerpo debía estar completo para la vida que les esperaba después de la muerte (Finch, 2011; Mhanna & Hasan, 2017). Usar material inerte subsanaba parcialmente la funcionalidad de la parte reemplazada, pero si se quiere llegar a cubrir por completo la función del órgano es necesario el uso de material vivo. Esto se empezó a llevar a cabo en el siglo XX cuando los avances médicos lograron que fuera posible trasplantar un órgano entero con el de un donante (Vacanti, 2010; Mhanna & Hasan, 2017).

Los avances trajeron consigo riesgos como el rechazo inmunológico a los injertos y trasplantes, y desventajas como tener que tomar inmunosupresores por el resto de tu vida para que el cuerpo del receptor no rechace el órgano, junto con todos los problemas que ello podría acarrear. Además, ya que el trasplante es la única solución para el fallo orgánico se convirtió en una técnica cada vez más utilizada, lo que condujo al problema principal del trasplante de órganos, la falta de donantes y el rechazo inmunológico. Por ello surgió la idea de crearlos *in vitro*, siendo los productos de piel los primeros en fabricarse en las décadas de 1970 y 1980.

Su éxito extendió la idea de hacerlo con el resto de los órganos y tejidos (Mhanna & Hasan, 2017), surgiendo un nuevo campo interdisciplinar, el más innovador y prometedor para crear reemplazos a los tejidos y órganos dañados, la ingeniería tisular (Bhatia & Chen, 1999; Mhanna & Hasan, 2017).

La ingeniería tisular es un campo de investigación interdisciplinar que usa células, biomateriales, señales bioquímicas y físicas, así como la combinación de todas ellas para producir estructuras biocompatibles que sirvan de sustitutos biológicos que puedan mantener, restaurar o mejorar las funciones de los tejidos dañados (Bhatia & Chen, 1999).

La estructura y función de un tejido están altamente relacionadas. Las células deben interactuar con su entorno, otras células y matriz extracelular, y percibir los estímulos adecuadamente para su desarrollo. Todo depende en cierta medida de la estructura del tejido. De hecho, las condiciones del microambiente que rodea a cada célula no solo determinan el comportamiento de esta sino que son esenciales para las propiedades emergentes de la red de trabajo multicelular. La función general de los órganos y tejidos recreados no será la

misma que la de los naturales si no se logra recrear su estructura, a todas las escalas (Bhatia & Chen, 1999).

La piel fue el primer tejido creado por la ingeniería tisular, su éxito fue lo que incitó a que quisieran crearse otros tejidos y órganos. El experimento de “la rata de Vacanti” (1995), la oreja creada y diseñada para un niño de tres años cultivada en un ratón inmunodeprimido usando una estructura construida con ácido poliglicólico y células de cartílago bovino que si fuera trasplantada provocaría una respuesta inmune severa, representó el principio de la ingeniería tisular para crear un órgano completo.

La piel tiene una estructura relativamente sencilla, que se crea con técnicas bidimensionales donde se cultivan células de un solo tipo celular a cada lado del andamio. Pasar a estructuras tridimensionales conlleva un aumento exponencial de complejidad debido a las limitaciones de las técnicas y de los conocimientos, sobre todo con relación a la vascularización de los tejidos multicelulares complejos en tres dimensiones, es decir, que deben tener un sistema de transporte de sustancias en los tejidos creados (Rouwkema *et al.*, 2008; Novosel *et al.*, 2011). En los órganos naturales esta función la lleva a cabo el sistema circulatorio. En los productos de la ingeniería tisular puede darse por medio de biorreactores o induciendo la neovascularización.

La medicina regenerativa es otro aspecto muy importante al tratar el campo de la ingeniería tisular ya que surgió gracias a la escasez de fuentes celulares para generar los tejidos e inició el uso de células madre troncales y progenitoras.

Actualmente la Ingeniería de Tejidos y la medicina regenerativa van de la mano, se le denomina TERM: “tissue engineering and medicine regenerative” y su finalidad principal es poder generar tejidos y órganos bioartificiales que supere la demanda del trasplante de órganos (Mhanna & Hasan, 2017).

2. OBJETIVO

El objetivo último del presente trabajo es realizar una revisión bibliográfica de las posibilidades de la ingeniería tisular, haciendo referencia a los procesos de creación de tejidos y órganos artificiales llevados a cabo en la actualidad, y a los que están más cerca de ser implantados en la práctica clínica.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Para el presente trabajo se revisó la bibliografía resultante de la búsqueda realizada empleando términos tales como: órgano artificial, fabricación de órganos, tejidos artificiales y métodos de fabricación de tejidos. Se realizó la búsqueda tanto en castellano como en inglés.

Los artículos científicos y un libro fueron recuperados a través de bases de datos a partir del NCBI (National Center for Biotechnology Information), filtrando por acceso a “free full text”, “books and documents” y “review”, y de buscar

directamente en Google Scholar, ordenando los resultados por relevancia y textos de cualquier fecha, disponibles en pdf. Además, se recuperaron artículos de la bibliografía de otros documentos. Se excluyeron los trabajos sobre el efecto de fármacos y biomoléculas.

El trabajo se centra en la información extraída del libro “Tissue Engineering for artificial organs. Regenerative Medicine, Smart Diagnostics and Personalized Medicine” (Hasan, 2017)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Ingeniería de Tejidos

La ingeniería tisular tiene tres pilares, tres campos en desarrollo, en los que se están investigando para poder conseguir su objetivo de crear órganos para cubrir las necesidades que dejan la gran falta de donantes, y son: i) los biomateriales para el andamio o “scaffold” donde generar el órgano bioartificial, ii) las células para que se generen los órganos y tejidos, y iii) las señales, la comunicación entre células con el microambiente en el que se encuentran y con el organismo al que van a ser implantados. Todo para conseguir un funcionamiento lo más parecido a un órgano natural (Figura 1) (Chan & Leong, 2008).

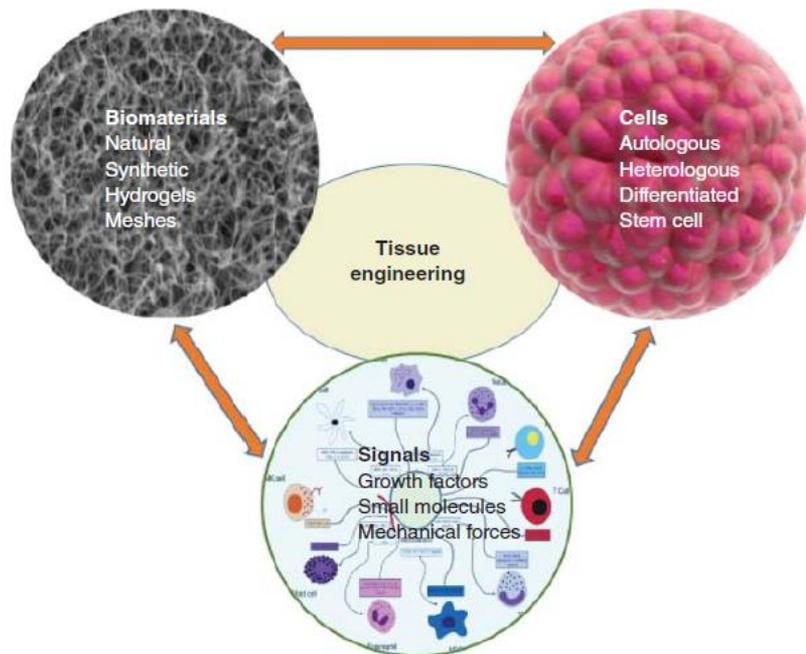


Figura 1: Esquema de los tres pilares de la ingeniería tisular (Chan & Leong, 2008).

Los tres pilares de la ingeniería tisular están interrelacionados y se necesita un conocimiento de los tres campos y un desarrollo equilibrado para llegar al resultado deseado de poder fabricar tejidos y órganos bioartificiales aptos para implantar, los cuales puedan producirse de manera generalizada para que se incluyan en la medicina clínica (Mhanna & Hasan, 2017).

4.1.1. Biomateriales y andamio/"scaffold"

Uno de los pilares de la ingeniería tisular es el andamio o "scaffold" (Figura 2), una estructura de materiales que permitan el crecimiento de las células que implantemos en él y que promueva el crecimiento del tejido una vez que estén implantadas. Lo más común es la creación de una estructura porosa de materiales sintéticos o naturales (Figura 2.1), ambos biodegradables, para que tras implantarse puedan ser sustituidos por tejido propio. Hay una inmensa variedad de biomateriales que se están estudiando, a fin de encontrar aquellos con los que crear un andamio que permita controlar sus propiedades fisicoquímicas. Una vez el soporte esté listo se pueden sembrar las células, en el interior de la estructura o en la superficie. El principal inconveniente de este método es que la implantación celular consume mucho tiempo y no es muy eficiente (Chan & Leong, 2008).

El método más eficiente en cuanto a la implantación de las células es ir encapsulándolas a medida que se va construyendo el andamio (Figura 2.4), pero no todos los biomateriales son aptos para este tipo de técnicas. Así, los más usados son los hidrogeles debido a su biocompatibilidad y a su capacidad de gelificar a temperaturas templadas, aunque por sus propiedades mecánicas no suelen ser usados en tejidos con un alto requerimiento de resistencia a fuerzas (Nicodemus & Bryant, 2007; Chan & Leong, 2008).

Otro de los métodos para generar un soporte estructural es la descelularización de la matriz extracelular (ECM) (Figura 2.2); este soporte es un andamio natural que permite que las células se adhieran, proliferen y se diferencien. Cuando se implanta con las células adecuadas se puede producir un tejido autólogo, sin la necesidad de extraerle tejido al paciente. La ventaja de este método es que presenta las propiedades mecánicas y biológicas más cercanas a las que necesita el receptor, además de ser biocompatible. La desventaja más notable es la falta de fuentes de tejidos autólogos, y que los no autólogos provocan respuesta inmune, junto con problemas menores tales como la distribución heterogénea de las células implantadas y la dificultad de eliminar todo aquello que pueda causar respuesta inmune (Chan & Leong, 2008; Cheng *et al.*, 2014). Tras la implantación de tejido creado se produce la degradación del andamiaje en sincronía con la formación de la nueva matriz extracelular, si este proceso no sucede de forma simultánea producirá fibrosis en el implante. Teniendo esto en cuenta, hay algunas aplicaciones para las que no son requeridas estructuras de soporte. Con el desarrollo de la medicina regenerativa las inyecciones de suspensiones celulares han dado buenos resultados para la reconstrucción de tejidos, sin embargo solo sirve para daños pequeños. Este método fue la base

para la creación de las láminas celulares, también denominada “cell sheet engineering” (Yamato & Okano, 2004).

El “cell sheet engineering” consiste en cultivar capas de tejido en placas que responden al calor (Figura 2.3). Se cultivan a 37 °C, si bien estas se desprenden al descender la temperatura de la placa a los 32 °C, manteniéndose intactas las uniones célula-célula y célula-matriz generada. Las células se recogen sin dañar la lámina y se usan para reparar tejidos (Yamato & Okano, 2004; Chan & Leong, 2008). A diferencia de lo que pasaba en los métodos mencionados anteriormente (donde la estructura que soporta las células implantadas está preestablecida) en este las células crecen como láminas de tejido independientes de una estructura de soporte previa, disminuyendo las probabilidades de que se produzca fibrosis.

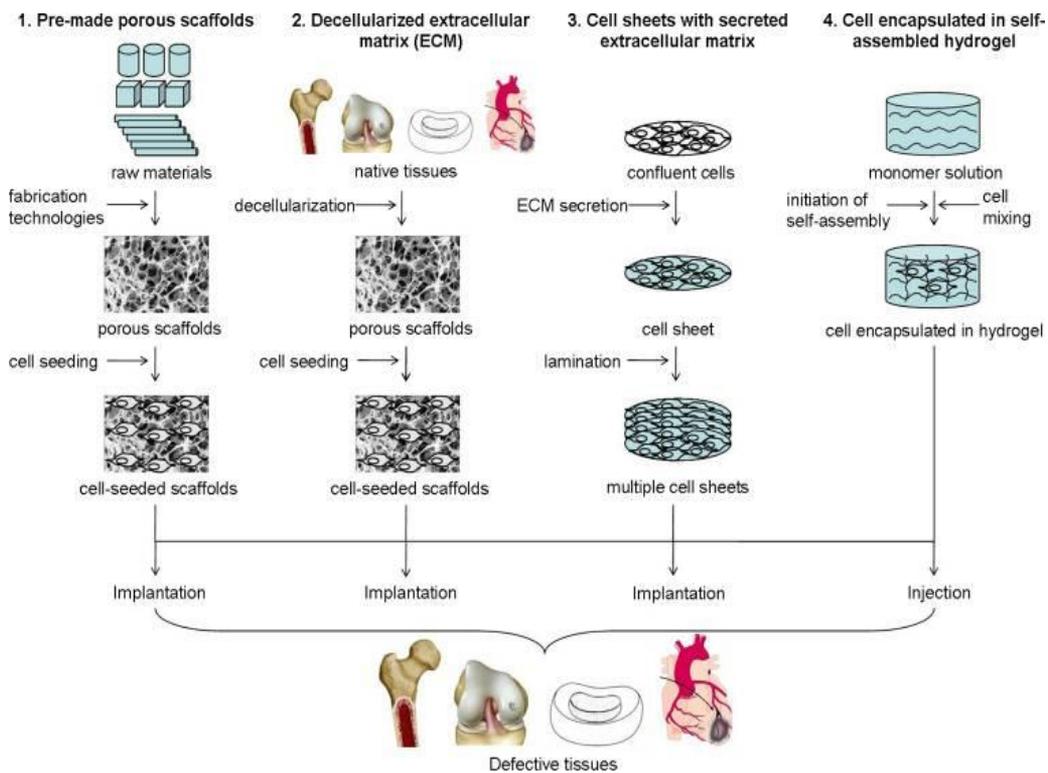


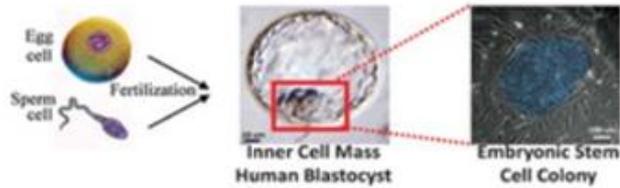
Figura 2: Esquema de las aproximaciones desarrolladas para generar los andamios en ingeniería tisular. 1: Creación de un andamio poroso. 2: Matriz extracelular descelularizada. 3: “Cell sheet engineering”. 4: Células encapsuladas durante la construcción del andamio. (Chan & Leong, 2008).

4.1.2. Células

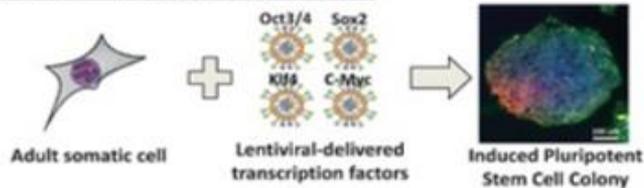
Las células son la unidad base de construcción en la ingeniería tisular y las más convenientes de usar son las autólogas, ya que no generan respuesta inmune, lo que evita que el paciente tenga que consumir inmunosupresores por el resto de su vida dado que podrían desencadenar otras enfermedades. Sin embargo, las células autólogas requieren largos periodos de cultivo para los tejidos

requeridos y son escasas en número, pero los obstáculos en el uso de células xenógenas o alógenas siguen siendo muchos (Mhanna & Hasan, 2017).

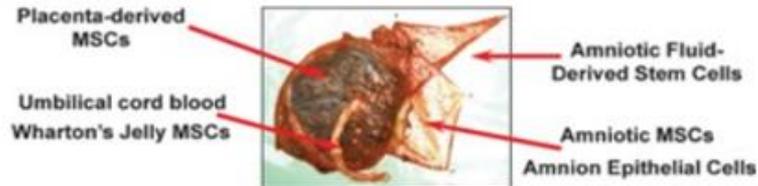
1 Embryonic Stem Cells



2 Induced Pluripotent Stem Cells



3 Gestational Stem Cells



4 Adult Stem Cells

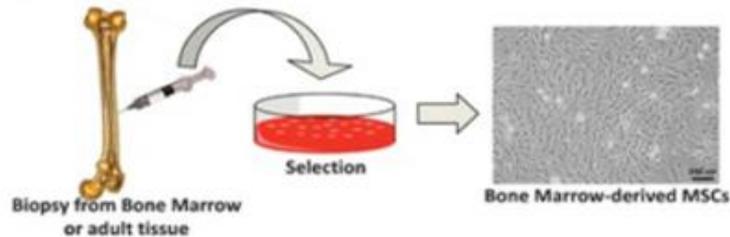


Figura 3: Descripción general de las fuentes y técnicas utilizadas para obtener (1) células madre embrionarias (ESC), (2) células madre pluripotentes inducidas (iPSC), (3) células madre gestacionales y (4) células madre adultas. Para cada categoría de células madre existen muchas técnicas diferentes que se pueden utilizar para generar poblaciones de células multipotentes o pluripotentes (Murphy & Atalaya, 2012).

Cada tipo de célula que podemos usar tiene sus características y requerimientos. Las más usadas son las células madre adultas o de tejido (Figura 3.4); son las que se encargan de la renovación de tejidos durante todo el desarrollo o si se produce alguna herida. Se han estudiado en profundidad *in vivo* pero, *in vitro*, su cultivo ha sido elusivo, debido a que es complicada su proliferación a largo plazo, además de presentar una autorrenovación limitada (Pedersen *et al.*, 2012). También se está empezando a generalizar el uso de células madre embrionarias (Figura 3.1), debido a su elevada tasa de autorrenovación, una baja tasa de proliferación tumoral y su capacidad de diferenciarse en muchos tipos celulares. Sin embargo, el uso de estas células presenta ciertos inconvenientes como que

pueden causar respuesta inmunitaria (por ser células alogénicas) y su obtención es cuestionable éticamente (implica matar el embrión en el proceso). Otro tipo de célula empleada en la Ingeniería de Tejidos son las células madre pluripotentes inducidas (iPSC: "induced pluripotent stem cells") (Figura 3.2); que abre la puerta a una nueva fuente de células madre autólogas (son células somáticas del paciente las cuales podemos inducir a que se conviertan a células madre). Sin embargo, durante el proceso de diferenciación al tipo celular deseado, tienen tendencia a reconvertirse al tipo celular que fueron antes de la inducción. Se requiere más investigación para evitar inconvenientes tales como la generación de tumores o que se produzca rechazo a causa de la reprogramación celular (Takahashi & Yamanaka, 2006). Aunque sea un recurso sin explotar, también se ha demostrado que el tejido gestacional puede ser una fuente de células madre multipotentes (Figura 3.3). Sin embargo para su uso las células tienen que mantenerse criogenizadas, lo que puede provocar su deterioro (Murphy & Atalaya, 2012; Mhanna & Hasan, 2017).

4.1.3. Señales

Las señales celulares son los estímulos físicos o bioquímicos que permiten a las células comunicarse entre ellas y con el microambiente celular. En los tejidos artificiales es necesario tener un control de estas señales para poder producir el resultado deseado. Para que los procesos de señalización se den de manera adecuada, el andamio debe tener unas características estructurales determinadas dependiendo del tipo de tejido que se quiera generar para que las células implantadas sobrevivan y proliferen, además de sustituir el andamio con matriz extracelular propia. Algunos ejemplos de señales son los niveles de oxígeno, estímulos mecánicos, factores de crecimiento, otras moléculas de la matriz en diferentes concentraciones, etc. Las señales celulares son muy importantes porque controlan procesos como la condensación de las células madre, la migración y la diferenciación celular, entre otros (Mhanna & Hasan, 2017).

4.2. Fabricación de tejidos y órganos

Para la fabricación de tejidos y órganos artificiales lo más parecidos posibles a los naturales se han desarrollado las técnicas de microfabricación, las cuales persiguen fabricar con la mayor precisión posible a la menor escala posible, tanto el andamio como el microambiente para tener todo controlado y obtener los resultados deseados, intentando recrear en su totalidad la función de tejidos y órganos naturales. Si bien queda mucho por avanzar en este campo, la microfabricación es un ámbito que ha jugado un papel importantísimo en cuanto a mejorar la precisión de la fabricación de los tejidos artificiales. La combinación de biomateriales junto con células específicas a microescala no garantiza que el tejido u órgano producido tenga el rendimiento de uno natural, ya que afectan más factores. El proceso consiste en fabricar un soporte altamente poroso al que se le implantan las células adecuadas (pre- o post-trasplante), posteriormente cultivadas junto con las señales adecuadas para su desarrollo en la dirección

deseada (Benoit *et al.*, 2008; Chan & Leong, 2008; Pedersen *et al.*, 2012; Mhanna *et al.*, 2013, 2014). Dicho soporte o andamio debe degradarse de manera sincronizada a la producción de nueva matriz extracelular, porque si no puede generar fibrosis, para alcanzar así la mayor similitud al tejido natural. La bioimpresión en 3D genera estructuras muy precisas y puede usarse para modificar la estructura y el comportamiento celular, lo cual es un logro notable en condiciones *in vitro* (Denk *et al.*, 1990; Kloxin *et al.*, 2009; Murphy & Atalaya, 2012; Mhanna & Hasan, 2017).

Para crear estructuras complejas en 3D como los órganos maduros se necesitan producir todas sus capas y componentes (células epiteliales y mesenquimáticas, nervios, vasos sanguíneos, la fascia, etc.); y la actividad de cada parte tiene que estar coordinada para alcanzar las funciones de un órgano *in vivo*. La maduración *in vitro*, que se produce generalmente en biorreactores, requiere meses de cultivo para que promueva la diferenciación celular, generando así células maduras específicas de tejido desde células madre pluripotenciales (Pedersen *et al.*, 2012). El poder producir directamente células diferenciadas maduras o reprogramar células diferenciadas a otro fenotipo gracias al entendimiento de la transcriptómica, proteómica y las redes metabólicas que están detrás de la maduración celular debería permitirnos reprogramar directamente las células pluripotentes altamente proliferativas o las células madre intermediarias a fenotipos adultos maduros. Enfrentando así los desafíos de escalas mayores y de madurez celular, lo que supone un gran avance para poder llegar a producir órganos enteros maduros de manera clínica (Vierbuchen & Wernig, 2011; Pedersen *et al.*, 2012).

Otro enfoque para producir tejidos y órganos artificiales consiste en generar subunidades funcionales del órgano *in vitro*, teniendo en cuenta que la mayor parte de los órganos están compuestos por subunidades funcionales fundamentales, en vez de crear el órgano o tejido entero. Se ha visto que estos tienen la capacidad de autoorganizarse con señales bioquímicas sencillas (Pedersen *et al.*, 2012). La capacidad de autoorganizarse no se produce solo en derivados endodérmicos (Yui *et al.*, 2012); distintos estudios muestran que también se da en otros tejidos como la hipófisis, la retina, los tejidos corticales y en el epitelio de las glándulas mamarias (Chanson *et al.*, 2011; Eiraku & Sasai, 2012). A estas subunidades funcionales esenciales con capacidad de autoorganización se les denominó organoides y el éxito de los organoides intestinales implicó que con los factores de crecimiento adecuados y estímulos bioquímicos sencillos las células madre pueden sustituir tanto las contribuciones mesenquimáticas instructivas como las permisivas (tipos de interacciones entre componentes mesenquimáticos y epiteliales durante la organogénesis embrionaria) una vez especificadas. Estas subunidades intestinales también se pueden generar a partir de células madre embrionarias y células madre pluripotentes inducidas humanas (Spence *et al.*, 2011; Kadzik & Morrisey, 2012), lo que da pruebas de que podemos crear *in vitro* todo el proceso de desarrollo desde la pluripotencia hasta el órgano funcional, aunque los organoides no

lleguen a producir la estructura completa ni reproducir las funciones en su totalidad (Pedersen *et al.*, 2012).

A la hora de crear tejidos y órganos tridimensionales *in vitro* uno de los principales retos a los que se enfrentan los investigadores es una adecuada distribución de nutrientes y demás moléculas necesarias para su desarrollo, así como recoger las sustancias de desecho, es decir, el desarrollo de un sistema de vascularización en dichos tejidos. En un principio, al crear tejidos que podían ser mantenidos por difusión, este problema no era notable, sin embargo, fue resaltando a medida que se querían construir estructuras tridimensionales complejas que ni siquiera la perfusión mediante biorreactores podía solventar. Hay dos corrientes principales de estrategias para alcanzar las estructuras más complejas: i) las estrategias basadas en el comportamiento celular, promoviendo la prevascularización promovida por células endoteliales y la neoangiogénesis por factores de crecimiento en los tejidos *in vitro*, y ii) las estrategias basadas en la fabricación del andamio, ya sea biológico o sintético. Aunque es difícil separar del todo ambos procesos ya que se encuentran imbricados (Novosel *et al.*, 2011).

4.3. Avances particulares en la producción de diferentes tejidos y órganos

En los logros de la ingeniería tisular de crear órganos y tejidos funcionales podemos abarcar los estudios en tres grandes grupos: producción de órganos/tejidos, ensayos en animales y experiencias en humanos (Aznar *et al.*, 2015). A continuación, se expondrán algunos ejemplos en cada apartado:

4.3.1. Producción de órganos/tejidos

Corazón: No se ha logrado más que crear pequeños fragmentos para tratar disfunciones en animales. En 2008 un equipo de investigación consiguió la producción de uno entero. Se descelularizaron corazones de cadáveres de rata, quedándose con la matriz (que mantuvo su estructura) y fue recelularizada con células madre cardíacas y endoteliales, la cual fue cultivada en un biorreactor que a los 8 días podía funcionar como bomba cardíaca (Ott *et al.*, 2008). El siguiente paso se dio en 2013, con la producción de un corazón híbrido animal-humano con la matriz descelularizada de corazón de rata y células iPSC derivadas de células progenitoras cardiovasculares. Se consiguió un corazón bioproducido que latió después de 20 días de cultivo (Lu *et al.*, 2013).

Intestino: Un grupo de investigación logró producir por primera vez una estructura tridimensional de tejido intestinal similar al natural. Establecieron un proceso para dirigir la diferenciación de células pluripotentes humanas en tejido intestinal embrionario. Indujeron las células pluripotentes a formar endodermo definitivo (lámina de células de la que deriva el epitelio intestinal embrionario), que con diferentes factores de crecimiento consiguieron producir estructuras tridimensionales con una arquitectura similar al tejido intestinal fetal. Tras la maduración de los organoides resultantes el tejido intestinal presentaba

funciones de absorción y secreción, así como marcadores y células características del tejido (Spence *et al.*, 2011).

Cerebro: Un grupo de investigadores ha logrado producir estructuras tridimensionales de tejido nervioso de hasta 4 mm de diámetro cuya estructura semeja la humana en sus primeros estadios de desarrollo, y lo lograron de diferentes zonas cerebrales con células iPSC (Lancaster *et al.*, 2013). Posteriormente, en 2014, otro grupo de investigadores también lograron algo similar, pero a partir de neuronas corticales de rata sembradas en una matriz de seda de seis anillos concéntricos con seis tipos de células neuronales que simulan las capas del córtex de mamíferos, con resultados muy parecidos a una estructura funcional (Daskalakis *et al.*, 2014).

Pulmón: Siguiendo las técnicas de Ott *et al.* (2008), más adelante Petersen *et al.* (2010) crearon pulmones bioartificiales que pudieron ser trasplantados a otros animales, manteniendo el intercambio gaseoso hasta 120 minutos. La matriz obtenida después de la descelularización mantuvo las estructuras respiratorias y vasculares. Se implantaron las células que dieron lugar a los vasos sanguíneos y al tejido respiratorio, y se cultivó en biorreactores. Dado el éxito de estos grupos de investigación y a que es fácil conseguir células autólogas humanas para producir tejido pulmonar es un procedimiento que podría pasar a la clínica humana, aunque hay que seguir investigando para una recelularización más efectiva y funcional (Wagner & Griffith, 2010).

Oreja: Cervantes *et al.* (2013) describen la posibilidad de crear una oreja bioartificial. A partir de un modelo tridimensional se generó un molde fortalecido con titanio y se recelularizó la matriz con condrocitos de oreja de personas adultas. Así, se insertan en ratas y dejan que maduren durante 12 semanas para finalmente conseguir la morfología adecuada.

Córnea y retina: En 2011 se consigue por primera vez crear ojo de ratón embrionario, a partir de células madre embrionarias diferenciadas en estructuras tridimensionales propias de la formación del ojo. Posteriormente se les añade Matrigel, que aporta la matriz extracelular y favorece el proceso de morfogénesis; formando así las copas retinianas con distintos marcadores de células neuronales de retina y del epitelio de retina pigmentada que prueba que son retinas verdaderas (Eiraku *et al.*, 2011).

4.3.2. Ensayos en animales

Tras lograr producirlos, el siguiente paso consistió en estudiar si los tejidos/órganos producidos se pueden trasplantar e integrar con el organismo (Aznar *et al.*, 2015).

Riñón: En 2013 se generaron estructuras renales tridimensionales a partir de riñones descelularizados de rata recelularizados con endotelio de vena umbilical y células renales de ratas recién nacidas, y trasplantadas posteriormente a ratas

con deficiencia renal; la estructura resultante logró ser funcionalmente activa (Song *et al.*, 2013). Ese mismo año se produjeron estructuras tridimensionales de riñón humano a partir de células pluripotenciales (células madre adultas, embrionarias e iPCS de piel humana y células renales de ratón), resultando en un tejido que expresaba marcadores de células renales (Xia *et al.*, 2013). Las estructuras generadas no presentaban el mismo rendimiento que un riñón natural.

Injertos vasculares: El grupo de investigadores de Dahl generó injertos vasculares iguales o mayores a 6 mm, que en caso de ser de entre 3-4 mm pudieron producirse en menos de un mes. Para ello usaron células alogénicas humanas o de perro que cultivaron en una matriz tubular de ácido poliglicólico, siendo sus propiedades mecánicas similares a las de los vasos sanguíneos humanos. Estas células se podían conservar largos periodos de tiempo a 4 °C. Los injertos humanos se evaluaron en un modelo de babuino con acceso para hemodiálisis. Los injertos caninos fueron probados en modelos de perro para *bypasses* periféricos y coronarios de arterias. Este tipo de injertos vasculares demostraron unas buenas propiedades mecánicas y pueden ser una opción viable para pacientes sin tejido autólogo viable o para aquellos que no son candidatos para los injertos sintéticos (Dahl *et al.*, 2011).

Hígado: Hay dos vías propuestas para la obtención de hígados. En el primer caso se descelulariza la matriz de hígado de ratas preservando su estructura y se recelulariza con hepatocitos adultos. El órgano producido tiene unos niveles funcionales muy semejantes a un órgano nativo (producción de albúmina, la producción de urea y expresión del citocromo P450) luego de ser trasplantado a ratas con un hígado deteriorado. Sin embargo la producción de un hígado completo aún es lejana ya que se necesitaría implantar células no parenquimatosas (Uygun *et al.*, 2010). En el segundo caso se producen estructuras hepáticas a partir de células iPCS del propio paciente (que se diferencian en células hepáticas) junto con células endoteliales de cordón umbilical y células trocales mesenquimales; se autoorganizan para formar yemas hepáticas *in vitro* funcionales de aproximadamente 4 mm. Se trasplantaron las yemas a una ventana craneal preformada o ciertos lugares en ratones diabéticos no obesos o con inmunodeficiencia severa. Fue la primera vez que se obtenían estructuras tridimensionales vascularizadas de tejido hepático y que después de 48 horas se conectaron a los sistemas vasculares favoreciendo su maduración (Takebe *et al.*, 2013).

4.3.3. Experiencias en humanos

Por último, se valora la utilidad clínica de los órganos humanos bioproducidos (Aznar *et al.*, 2015).

Cartílago nasal: Para reparar el daño de pérdida de cartílago nasal (generalmente al extirpar melanomas de la zona de la nariz), se ha propuesto un trasplante de cartílago nasal autólogo bioproducido sobre una matriz

descelularizada de cartílago hialino porcino y recelularizado con condrocitos del *septum* del paciente. A los 12 meses no se detectó ninguna complicación pero si regeneración de la nariz (Fulco *et al.*, 2014).

Vasos sanguíneos: Se bioprodujo un fragmento de vena recelularizando (con células endoteliales y de músculo liso diferenciadas de células madre obtenidas de la médula ósea del paciente) un segmento de 9 cm de vena ilíaca de un donante alogénico, que fue injertado en una niña de 10 años que sufría de una obstrucción en la vena hepática, y se le realizó un *bypass*. Al primer intento se observó que el flujo disminuyó al cabo de un año. Se hizo otro trasplante con una vena bioproducida y recuperó el flujo normal (Olausson *et al.*, 2012).

Vagina: Se llevó a cabo un estudio clínico en 4 chicas de entre 13 y 18 años que sufrían del síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser y para las cuales se crearon vaginas bioproducidas. A través de una biopsia se obtuvo material vulvar a partir de la cual se cultivaron, expandieron y sembraron células epiteliales y musculares en una matriz biodegradable (obtenida de submucosa intestinal porcina descclularizada). Estas fueron trasplantadas a las 4 jóvenes que se hicieron revisiones anuales durante 8 años y se comprobó que tenían una estructura y un funcionamiento similar al de una vagina normal (Raya-Rivera *et al.*, 2014).

5. BIOIMPRESIÓN 3D: PERSPECTIVAS DE FUTURO

La bioimpresión en 3D es el siguiente paso en crear órganos y tejidos bioartificiales de manera muy precisa y personalizada; lo cual logrará que se esté más cerca de poder implantar la biofabricación de órganos en la medicina del futuro. Este es uno de los métodos más novedosos en la creación de andamios celularizados en los que las células pueden diferenciarse y proliferar creando implantes personalizados, lo que conlleva un gran avance en la medicina (Pavan & Kumar, 2022).

La bioimpresión en 3D (conocida como una tecnología de manufacturación aditiva) es una tecnología en desarrollo que se está volviendo cada vez más notoria en la medicina. Como se puede observar en la figura 4, la bioimpresión 3D influye directamente en 4 campos de acción: i) drogas y medicinas, ii) medicina regenerativa, iii) impresión de modelos de órganos para su estudio, y iv) impresión de órganos funcionales. Dadas sus características es el método preferente al crear modelos de órganos para su estudio (Gupta & Bit, 2022).

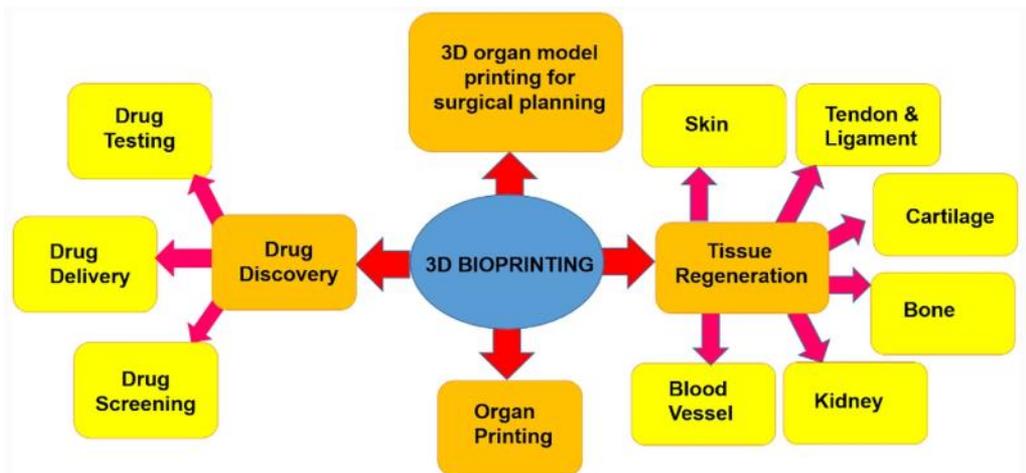


Figura 4: Esquema de los campos de acción de la bioimpresión 3D en la medicina (Gupta & Bit, 2022).

La bioimpresión permite construir órganos y tejidos en condiciones ambientales debido a que es posible usar células y biomateriales como la tinta de las bioimpresoras (bioink/biotintas), al contrario que las impresoras 3D convencionales en cuyo proceso de impresión se dan condiciones incompatibles con la viabilidad celular. La tecnología de la bioimpresión 3D permite tener control, durante la impresión, de la disposición espacial que deben tener las células, las macromoléculas, los componentes de la matriz extracelular, etc., de forma que simulan tejidos naturales (Gupta & Bit, 2022).

La bioimpresión se produce capa a capa y son necesarios los materiales adecuados para formar los tejidos y órganos como los materiales de soporte (polímeros, matriz extracelular, proteínas como la seda e hidrogeles), las células y moléculas que permitan un correcto desarrollo de tejidos y órganos. También es necesaria una imagen de alta resolución y/o gran cantidad de datos del órgano o tejido a producir para que el CAD (“Computer-Aided Design” o diseño asistido por ordenador) genere un modelo tridimensional lo más fidedigno posible al órgano o tejido natural. Algunas de las ventajas de este método son que nos permite un posicionamiento celular preciso, producir tejidos de elevada densidad celular y generar tejidos vascularizados. Pero aún hay que solucionar ciertos problemas como que es difícil imprimir órganos y tejidos de tamaño clínico, lograr compaginar diferentes tipos celulares para poder generar órganos de geometría compleja y aunque se puedan generar tejidos vascularizados lograr una integración con el sistema vascular del organismo aún es complicado. Además de que no se puede garantizar al 100% la funcionalidad de los tejidos producidos (Jin *et al.*, 2021; Gupta & Bit, 2022).

Hasta ahora el principal uso de esta tecnología era crear los tejidos *in vitro*, pero está siendo reemplazado por la bioimpresión *in situ* e *in vivo*, donde se fabrican los tejidos directamente en aquellos tejidos dañados de los pacientes dando un empujón a la medicina regenerativa. Mediante bioimpresión en 3D se han

construido modelos de órganos y tejidos que facilitan el estudio de las operaciones a los cirujanos, así como el aprendizaje a los estudiantes o a los grupos de investigación que imprimen modelos de órganos con determinadas patologías. Como culmen de la influencia de la bioimpresión en la medicina se han producido varios tipos de tejidos/órganos sencillos como: piel, hueso y cartílago. También se ha logrado construir órganos más complejos como: hígado, riñón y corazón (Gupta & Bit, 2022).

Actualmente, hay tres técnicas principales de bioimpresión en 3D basadas en el modo de trabajo: extrusión, inkjet y láser.

5.1. Extrusión

En esta técnica los materiales son dispensados a la fuerza a través de una boquilla. En comparación a los otros dos métodos, este es económico, pero también relativamente más lento. Se puede controlar la temperatura tanto de la boquilla como de la plataforma donde se deposita lo que se está imprimiendo. El control de la temperatura permite la impresión con una gran variedad de biomateriales con células encapsuladas y altas densidades celulares de manera homogénea; proporcionándoles una elevada viabilidad. La resolución de la impresión de este método depende del tamaño de la boquilla, la viscosidad del material y el efecto de la tensión al ser dispensado (Gupta *et al.*, 2018; Gupta & Bit, 2022).

5.2. Inkjet

Este tipo de bioimpresión ofrece una elevada resolución con pequeñas cantidades de biotinta. El proceso consiste en la formación de gotas depositadas en un lugar concreto y su interacción con el sustrato (hidrogeles o placas de cultivo) donde se depositan. Puede producirse de dos maneras: continua y bajo demanda. El primero trabaja a mayor frecuencia y con gotas de mayor tamaño que el segundo, si bien el segundo tiene una mayor resolución. En el método continuo las gotas están cargadas eléctricamente y se posicionan según campos magnéticos o eléctricos; en el método bajo demanda se produce presión para liberar la gota solo cuando es necesario. La biotinta se solidifica en la geometría preestablecida antes de que se deposite la siguiente capa. Al contrario que en el método de extrusión en este método la viabilidad celular es menor y la variedad de biotintas que se pueden usar es más limitada (Gupta & Bit, 2022).

5.3. Láser

Este método se basa en una fuente de láser pulsado que se enfoca sobre la cinta (formada por una fina capa de metal con una fina capa de la biotinta) generando la formación de una gota por vaporización. La deposición de las gotas está controlada de manera computarizada. Al contrario que en los otros dos métodos no hay boquillas por lo que no se produce obstrucción de las mismas, tiene un alto control sobre la densidad celular, la elevada deposición celular y el control

sobre la organización celular, es decir, tiene una mayor resolución y eficacia que los otros métodos. Estas bioimpresoras permiten imprimir células viables de diferentes tipos en estructuras que imitan tejidos y órganos (Gupta & Bit, 2022).

6. CONCLUSIONES / CONCLUSIÓNS / CONCLUSIONS

CONCLUSIONES

Tras la revisión bibliográfica de los aspectos más importantes en la fabricación de órganos y tejidos artificiales funcionales, cabría destacar:

- El gran avance científico habido en el campo interdisciplinar de la Ingeniería de Tejidos, que en la actualidad todavía se encuentra en expansión, permite que cada vez se esté más cerca de poder hacer frente a la demanda de trasplantes. Son muchos los experimentos y experiencias que se están llevando a cabo con la finalidad de diseñar órganos artificiales completos implantables en seres humanos, pero todavía es necesario continuar con las investigaciones para conseguir resultados exitosos y establecer procesos estandarizados.
- La Ingeniería de Tejidos se ha visto influenciada por los avances tecnológicos, permitiendo el desarrollo de órganos y tejidos artificiales cada vez con mayor semejanza a los naturales. En la actualidad la tecnología más vanguardista es la bioimpresión 3D, que permitirá la fabricación de órganos y tejidos artificiales de una forma más precisa, rápida y eficaz.

CONCLUSIÓNS

Tras a revisión bibliográfica dos aspectos máis importantes na fabricación de órganos e tecidos artificiais funcionais, cabería destacar:

- O gran avance científico habido no campo interdisciplinar da Enxeñería de Tecidos, que na actualidade aínda se atopa en expansión, permite que cada vez se estea máis preto de poder facer fronte á demanda de trasplantes. Son moitos os experimentos e experiencias que se están levando a cabo coa finalidade de deseñar órganos artificiais completos implantables en seres humanos, pero aínda é necesario continuar coas investigacións para conseguir resultados exitosos e establecer procesos estandarizados.
- A Enxeñería de Tecidos viuse influenciada polos avances tecnolóxicos, permitindo o desenvolvemento de órganos e tecidos artificiais cada vez con maior semellanza aos naturais. Na actualidade a tecnoloxía máis vangardista é a bioimpresión 3D, que permitirá a fabricación de órganos e tecidos artificiais dunha forma máis precisa, rápida e eficaz.

CONCLUSIONS

Following the bibliographical review of the most important aspects in the manufacture of functional artificial organs and tissues, the following should be highlighted:

- The great scientific progress made in the interdisciplinary field of Tissue Engineering, which is currently still expanding, means that we are getting closer and closer to being able to meet the demand for transplants. Many experiments and experiments are being carried out with the aim of designing complete artificial organs that can be implanted in humans, but further research is still needed to achieve successful results and establish standardised processes.
- Tissue engineering has been influenced by technological advances, allowing the development of artificial organs and tissues that are increasingly similar to natural ones. Currently, the most cutting-edge technology is 3D bioprinting, which will allow the manufacture of artificial organs and tissues in a more precise, fast and efficient way.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aznar, J., Tudela, J. & Sánchez, J.L. (2015). Producción de órganos bioartificiales. *Cuadernos de Bioética* XXVI.
- Benoit, D.S.W., Schwartz, M.P., Durney, A.R. & Anseth, K.S. (2008). Small functional groups for controlled differentiation of hydrogel-encapsulated human mesenchymal stem cells. *Nature Materials*, 7, 816-823. DOI: 10.1038/nmat2269
- Bhatia, S.N. & Chen, C.S. (1999). Tissue Engineering at the Micro-scale. *Biomedical Microdevices*, 2 (2), 131-144. DOI: 10.1023/A:1009949704750
- Cervantes, T.M., Bassett, E.K., Tseng, A., Kimura, A., Roscioli, N., Randolph, M.A., Vavanti, J.P., Hadlock, T.A., Gupta, R., Pomerantseva, I. & Sundback, C.A. (2013). Design of composite scaffolds and three-dimensional shape analysis for tissue-engineered ear. *Journal of the Royal Society Interface*, 10 (87). DOI: 10.1098/rsif.2013.0413
- Chan, B.P. & Leong, K.W. (2008). Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal*. 17, 467-479. DOI: 10.1007/s00586-008-0745-3
- Chanson, L., Brownfield, D., Garbe, J.C., Kuhn, I., Stampfer, M.R., Bissel, M.J. & LaBarge, M.A. (2011). Self-organization is a dynamic and lineage-intrinsic property of mammary epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (8), 3264-3269. DOI: 10.1073/pnas.1019556108
- Cheng, C.W., Solorio, L.D. & Alsberg, E. (2014). Tejido descelularizado y matrices extracelulares derivadas de células como andamios para la ingeniería de tejidos ortopédicos. *Avances en Biotecnología*, 32 (2), 462-484. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.12.012
- Dahl, S.L., Kypson, A.P., Lawson, J.H., Blum, J.L., Strader, J.T., Li, Y., Manson, R.J., Tente, W.E., DiBernardo, L., Hensley, M.T., Carter, R., Williams, T.P., Prichard, H.L., Dey, M.S., Begelman, K.G. & Niklason, L.E. (2011). Readily available tissue-engineered vascular grafts. *Science Translational Medicine*, 3 (68), 68ra9. DOI: 10.1126/scitranslmed.3001426
- Daskalakis, N.P., Cohen, H., Cai, G., Buxbaum, J.D. & Yehuda, R. (2014). Expression profiling associates blood and brain glucocorticoid receptor signaling with trauma-related individual differences in both sexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111 (37), 13529-13534. DOI: 10.1073/pnas.1401660111
- Denk, W., Strickler, J.H., & Webb, W.W. (1990). Two-Photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248, 73-76. DOI: <http://www.jstor.org/stable/2874052>
- Eiraku, M. & Sasai, Y. (2012). Self-formation of layered neural structures in three-dimensional culture of ES cells. *Current Opinion in Neurobiology*, 22, 768-777. DOI: 10.1016/j.conb.2012.02.005
- 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. DOI: 10.1038/nature09941
- Finch, J. (2011). The ancient origins of prosthetic medicine. *Lancet*, 377 (9765), 548-549. DOI: 10.1016/s0140-6736(11)60190-6
- Fulco, I., Miot, S., Haug, M.D., Barbero, A., Wixmerten, A., Feliciano, S., Wolf, F., Jundt, G., Marsano, A., Farhadi, J., Heberer, M., Jakob, M., Schaefer, D.J. & Martin, I. (2014). Engineered autologous cartilage tissue for nasal reconstruction after tumour resection: an observational first-in-human trial. *Lancet*, 384 (9940), 337-346. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)60544-4
- Gupta, S., Bissoyi, A. & Bit, A. (2018). A review on 3D printable techniques for tissue engineering. *BioNanoScience*, 8, 868-883. DOI: 10.1007/s12668-018-0525-4
- Gupta, S. & Bit, A. (2022). 3D bioprinting in tissue engineering and regenerative medicine. *Cell and Tissue Banking*, 23, 199-212. DOI: 10.1007/s10561-021-09936-6
- Hasan, A. (2017). A Tissue Engineering for artificial organs. Regenerative Medicine, Smart Diagnostics and Personalized Medicine. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA Weinheim. ISBN: 978-3-527-68994-1
- Jin, Z., Li, Y., Yu, K., Liu, L., Fu, J., Yao, X., Zhang, A. & He, Y. (2021). 3D printing of physical organ models: recent developments and challenges. *Advanced Science*, 8 (17), 2101394. DOI: 10.1002/advs.202101394
- Kadzic, R.S. & Morrisey, E.E. (2012). Directing lung endodermal differentiation in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 10, 335-361. DOI: 10.1016/j.stem.2012.03.013
- Kloxin, A.M., Kasko, A.M., Salinas, C.N. & Anseth, K.S. (2009). Photodegradable hydrogels for dynamic tuning of physical and chemical properties. *Science*, 324, 59-63. DOI: 10.1126/science.1169494
- Lancaster, M.A., Renner, M., Martin, C.A., Wenzel, D., Bicknell, L.S., Hurles, M.E., Homfray, T., Penninger, J. M., Jackson, A.P. & Knoblich, J.A. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*, 501, 373-379. DOI: 10.1038/nature12517
- Lu, T-Y., Lin, B., Kim, J., Sullivan, M., Tobita, K., Salama, G. & Yang, L. (2013). Repopulation of decellularized mouse heart with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular progenitor cells. *Nature Communications*, 4, 2307. DOI: 10.1038/ncomms3307
- Mhanna, R. & Hasan, A. (2017). Introduction to Tissue Engineering en Hasan, A Tissue Engineering for artificial organs. Regenerative Medicine, Smart Diagnostics and Personalized Medicine. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA Weinheim. ISBN: 978-3-527-68994-1
- Mhanna, R., Kashyap, A., Palazzolo, G., Vallmajo-Martin, Q., Becher, J., Möller, S., Schnabelrauch, S.M. & Zenobi-Wong, M. (2014). Chondrocyte culture in three dimensional alginate sulfate hydrogels promotes proliferation while maintaining expression of chondrogenic markers. *Tissue Engineering Part A*, 20, 1454-1464. DOI: 10.1089/ten.TEA.2013.0544

- Mhanna, R., Öztürk, E., Schlink, P. & Zenobi-Wong, M. (2013). Probing the microenvironmental conditions for induction of superficial zone protein expression. *Osteoarthritis Cartilage*, 21, 1924-1932. DOI: 10.1016/j.joca.2013.08.017
- Murphy, S.V. & Atalaya, A. (2012). Organ engineering – combining stem cells, biomaterials, and bioreactors to produce bioengineered organs for transplantation. *BioEssays*, 35, 163-172. DOI: 10.1002/bies.201200062
- Nicodemus, G.D. & Bryant, S.J. (2008). Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 14 (2), 149-165. DOI: 10.1089/ten.teb.2007.0332
- Novosel, E.C., Kleinans, C. & Kluger, P.J. (2011). Vascularization is the key challenge in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, 300-311. DOI: 10.1016/j.addr.2011.03.004
- Olausson, M., Patil, P.B., Kuna, V.K., Chougule, P., Hernandez, N., Methe, K., Kullberg-Lindh, C., Borg, H., Ejnell, H. & Sumitran-Holgersson, S. (2012). Transplantation of an allogeneic vein bioengineered with autologous stem cells: a proof-of-concept study. *Lancet*, 380 (9838), 230-237. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60633-3
- Ott, H.C., Matthiesen, T.S., Goh, S.K., Black, L.D., Kren, S.M., Netoff, T.I. & Taylor, D.A. (2008). Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nature medicine*, 14 (2), 213-221. DOI: 10.1038/nm1684
- Pavan, B.G. & Kumar, L. (2022). 3D Printing: applications in tissue engineering, medical devices, and drug delivery. *American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech*, 23, 92. DOI: 10.1208/s12249-022-02242-8
- Pedersen, R.A., Mascetti, V. & Mendjan, S. (2012). Synthetic organs for regenerative medicine. *Cell Stem Cell*, 10 (6), 646-647. DOI: 10.1016/j.stem.2012.04.003
- Petersen, T.H., Calle, E.A., Zhao, L., Lee, E.J., Gui, L., Raredon, M.B., Gavrillov, K., Yi, T., Zhuang, Z.W., Breuer, C., Herzog, E. & Niklason, L.E. (2010). Tissue-engineered lungs for in vivo implantation. *Science*, 329 (5991), 538-541. DOI: 10.1126/science.1189345
- Raya-Rivera, A.M., Esquiliano, D., Fierro-Pastrana, R., López-Bayghen, E., Valencia, P., Ordorica-Flores, R., Soker, S., Yoo, J.J. & Atala, A. (2014). Tissue-engineered autologous vaginal organs in patients: a pilot cohort study. *Lancet*, 384 (9940), 329-336. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)60542-0
- Rouwkema, J., Rivron, N.C. & van Blitterswijk, C.A. (2008). Vascularization in tissue engineering. *Trends in Biotechnology*, 26, 434-441. DOI: 10.1016/j.tibtech.2008.04.009
- Song, J.J., Guyette, J., Gilpin, S., Gonzalez, G., Vacanti, J.P. & Ott, H.C. (2013). Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney. *Nature Medicine*, 19, 646-651. DOI: 10.1038/nm.3154

- Spence, J.R., Mayhew, C.N., Rankin, S.A., Kuhar, M.F., Vallance, J.E., Tolle, K., Hoskins, E.E., Kalinichenko, V.V., Wells, S.I., Zorn, A.M., Shroyer, N.F. & Wells, J.M. (2011). Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue *in vitro*. *Nature*, 470, 105-109. DOI: 10.1038/nature09691
- Takahashi, K. & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, 663-676. DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.024
- Takebe, T., Sekine, K., Enomura, M., Koike, H., Kimura, M., Ogaeri, T., Zhang, R.R., Ueno, Y., Zheng, Y.W., Koike, N., Aoyama, S., Adachi, Y. & Taniguchi, H. (2013). Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature*, 25, 499, 481-484. DOI: 10.1038/nature12271
- Uygun, B.E., Soto-Gutierrez, A., Yagi, H., Izamis, M.L., Guzzardi, M.A., Shulman, C., Milwid, J., Kobayashi, N., Tilles, A., Berthiaume, F., Hertl, M., Nahmias, Y., Yarmush, M.L. & Uygun, K. (2010). Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nature Medicine*, 7, 814-820. DOI: 10.1038/nm.2170
- Vacanti, J. (2010). Tissue engineering and regenerative medicine: From first principles to state of the art. *Journal of Pediatric Surgery*, 45 (2), 291-294. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2009.10.063
- Vierbuchen, T. & Wernig, M. (2011). Direct lineage conversions: unnatural but useful? *Nature Biotechnology*, 29, 892-907. DOI: 10.1038/nbt.1946
- Wagner, W.R. & Griffith, B.P. (2010). Reconstructing the Lung. *Science*, 329, 520-522. DOI: 10.1126/science.1194087
- Xia, Y., Nivet, E., Sancho-Martinez, I., Gallegos, T., Suzuki, K., Okamura, D., Wu, M.Z., Dubova, I., Rodriguez, C., Montserrat, N., Campistol, J.M. & Izpizua, J.C. (2013). Directed differentiation of human pluripotent cells to ureteric bud kidney progenitor-like cells. *Nature Cell Biology*, 15, 1507-1515. DOI: 10.1038/ncb2872
- Yamato, M. & Okano, T. (2004). Cell sheet engineering. *Materials Today*, 7 (5), 42-47. DOI: 10.1016/S1369-7021(04)00234-2
- Yui, S., Nakamura, T., Sato, T., Nemoto, Y., Mizutani, T., Zheng, X., Ichinose, S., Nagaishi, T., Okamoto, R., Tsuchiya, K., Clevers, H. & Watanabe, M. (2012). Functional engraftment of colon epithelium expanded *in vitro* from a single adult Lgr5+ stem cell. *Nature Medicine*, 18, 618-623. DOI: 10.1038/nm.2695