

AVANCES EN XENO-TRASPLANTE, BIO-IMPRESIÓN ADITIVA 3D Y MANIPULACIÓN GÉNICA PARA EL FUTURO DEL TRASPLANTE CARDIACO

ADVANCES IN XENOTRANSPLANTATION, 3D ADDITIVE BIOPRINTING AND GENE THERAPY FOR THE FUTURE OF HEART TRANSPLANTATION

Carlos García- Montero Blanco¹

1. Miembro Honorario Sociedad Española de Cirugía Cardiovascular y Terapia Endovascular.

Palabras clave:

Corazón;
Xenotrasplante;
Bioimpresión aditiva;
Descelularización;
Manipulación génica;
Ingeniería tisular.

Keywords:

Heart;
Xenotransplantation;
Additive bioprinting;
Decellularization;
Tissue engineering;
Gene therapy.

Resumen

El trasplante cardiaco (TxC) es la única y mejor opción de tratamiento disponible para mejorar o salvar la vida de pacientes con insuficiencia cardiaca terminal. El gran desarrollo de los trasplantes de órganos, tanto en número, como en resultados, y la supervivencia actuarial acumulada a largo plazo, ha multiplicado la demanda de este tipo de procedimientos de una manera imparable, generando una gran desproporción entre la oferta de órganos disponibles y la demanda. Esta tendencia provoca que la escasez de órganos donantes, sea hoy en día, la principal limitación de los trasplantes y no parece solucionable con los criterios expandidos de edad y donación por muerte circulatoria. El TxC es una realidad para sólo un 10-15% de los receptores en lista de espera, de los que una pequeña parte podrían ser candidatos a un xenoinjerto porcino. La alternativa para una gran mayoría de los pacientes sería la ingeniería tisular, englobando las *técnicas de regeneración celular* con factores angiogénicos, la construcción de *matrices biológicas* y el uso de *biopolímeros compatibles*, para fabricar un corazón *de novo*, antigénicamente idéntico al receptor. En este trabajo, se revisan la evolución, alcance y resultados de las propuestas más realistas a la escasez de órganos para TxC: xenotrasplante, bioimpresión aditiva en 3D (BIA3D) y la terapia génica.

Abstract

Heart transplantation (HTx) has proved itself to be the definite therapy for patients with end-stage cardiac failure. While HTx remains the cornerstone of the surgical armamentarium, its long-term success has resulted in an unbalanced supply-demand equation due to severe scarcity of valid organ donors. Therefore, further developments in the field of transplant therapy remain curtailed, unless other resources are encouraged. The present report is a review on the concept evolution, present status and reasonable outlook of three different, but confluent, emerging therapies, namely, a) xenotransplantation, b) 3D additive bioprinting and c) gene therapy.

En las dos últimas décadas se han producido importantes progresos en el tratamiento de pacientes con insuficiencia cardiaca terminal, incluyendo nuevos y más efectivos fármacos y dispositivos de asistencia mecánica circulatoria más biocompatibles. Sin embargo, el trasplante cardiaco (TxC) sigue siendo el método idóneo para manejar estos pacientes. A nivel estratégico, la escasez de órganos donantes, es el auténtico cuello de botella de los programas de trasplantes, incluso en España, país del mundo con mayor tasa de donación de órganos por millón de habitantes, duplicando la media -18.4 p.m.p- europea. Esta generosidad y la eficacia de la O. N.T. (Organi-

zación Nacional de Trasplantes) se plasmaron en 2021 en 4.781 trasplantes¹ (2.950 renales, 1.078 hepáticos, 362 pulmonares, 302 cardíacos, 82 de páncreas y 7 intestinales) gracias a 2.229 donantes (40,2 por millón de habitantes). De acuerdo al registro publicado en la *Newsletter Transplant*, recopilado por el *European Council for Quality of Medicine and Healthcare*, en el año 2020 se realizaron a nivel mundial 125.482 trasplantes, de los que 7928 fueron TxC, lo que supone un 10% de la demanda total. Solamente en Europa a final de 2020 había 57.717 pacientes en lista de espera para trasplante y cada día fallecen 11 personas de esa lista en espera de un órgano donante².

Autor para la correspondencia

Carlos García- Montero Blanco
Real Academia Nacional de Medicina de España
C/ Arrieta, 12 · 28013 Madrid
Tlf.: +34 609 154 345 | E-Mail: carloscruzgarciamontero@gmail.com

1. XENO-TRASPLANTE CARDIACO

Introducción

La imagen híbrida de un humano con aspecto animal se encuentra en la mitología de casi todas las culturas: el dios egipcio *Hanubis* tenía cabeza de chacal, de elefante el dios indio *Gamesh* o de toro, el minotauro griego. Y, más recientemente, los experimentos del ruso *V. Demikhov*, consistentes en el alotrasplante cervical heterotópico de una cabeza de perro. Sin embargo, el pionero de la triangulación en las anastomosis vasculares que han hecho posible las técnicas del Tx, fue *Alexis Carrel*. Las experiencias anteriores de xeno-trasplante renal fracasaron por trombosis a nivel de las suturas (Tabla 1).

receptor⁴. El injerto no generó el gasto cardiaco necesario y el paciente falleció en quirófano. Tras el primer alo-TxC humano, el grupo de *Barnard* continuó realizando X-TxC de chimpancé, hasta el caso *Baby Fae*, de una paciente afecta de corazón izquierdo hipoplásico y que recibió el corazón de un babuino⁵ (Tabla 2).

Desarrollo y evolución del xeno-TxC

El primer modelo de X-Tx cerdo- babuino concluyó con rechazo hiperagudo del injerto. La identificación del carbohidrato galactosa- α 1,3- galactosa como el principal xeno-antígeno responsable del fracaso inmediato del injerto corresponde al grupo de *Cooper*, tras observar una cierta "acomodación" en los Tx renales cerdo-humano después de la

Tabla 1.- Historia del xeno-trasplante. Compartimentos extratorácicos*

Año	Tejido/ órgano	Autor	Comentarios
1667	Sangre cordero- (h)	Jean Baptiste Denis	Inciertos. Prohibición.
1920	Testículos chimpancé	Serge Voronoff	"rejuvenecimiento"
1963	Riñón primate	Keith Reemtsma	+ rechazo precoz. 1 caso + brusca p 9 mes
1969	Hígado babuino	Thomas Starzl	+ rechazo precoz. 1 caso (tacrolimus) + 2 mes
1992	1er cerdo transgénico hDAF	D. White/ IMUTRAN	Factor deterioro acelerado del C*
1993	Islotes páncreas cerdo- pats DB	C, Gustav Groth	No beneficio clínico
2001	Id.y céls. Sertoli- niños DB	R. Valdés/ D. White	1 caso sin insulina 1 año
2001	1er cerdo GT KO	L. Lai& R. Prather/ IMMERGE BioTher.	Supresión gen α -1,3 galactosiltransferasa
2016	1er hígado porcino GTKO- babuino	Shah y col	+ en POD # 25

Mod. de Aristizabal y col. *Cir. Esp.* 2017; 95 (2): 62-72
+: muerte / POD: postoperatorio día.

Uno de los pasos iniciales relevantes fue llevado a cabo por *Reemtsma* y col., quienes trasplantaron 13 riñones de chimpancé a humanos, logrando supervivencias de 11 días a 9 meses³, y utilizando radiación total como método inmunosupresor. *Hardy*, cardiocirujano en Mississippi, realizó el primer xeno-TxC (X-TxC), en un paciente con arteriosclerosis severa y amputación de una pierna, que difícilmente sería hoy considerado como

plasmaféresis del receptor⁶. De forma similar, al "lavar" el corazón *ex vivo* con plasma humano, se producía la fijación de anticuerpos al endotelio, y cuyo análisis mostró la galactosa como inductor del rechazo inmediato al órgano. Desde ese momento, la producción de cerdos transgénicos GTKO (α 1,3 galactosyltransferase knockout) con anulación de la molécula de azúcar endotelial es el pilar básico para superar la fase aguda del X-Tx cerdo-humano.

Tabla 2. Historia del xeno-trasplante de corazón*.

Autor (país)	Año	Animal donante	Supervivencia
J. Hardy (EEUU)	1964	Chimpancé	90 min.
D. Ross (Inglaterra)	1968	Cerdo	4 min.
D. Cooley (EEUU)	1968	Oveja	10 min.
P. Marion (Francia)	1969	Chimpancé	5 min.
C. Barnard (Sudáfrica)	1977	Chimpancé	4 d.
L. Bailey (EEUU)	1984	Babuino	20 d.
Z. Religa (Polonia)	1992	Cerdo	23 h.
D. Barvah (India)	1996	Cerdo	7 d.
Griffith&Mohiuddin (EEUU)	2022	Cerdo	60 d.

*Mod.de Wadiwala I J y col. (June 24, 2022. *Cureus* 14(6): e26284.

Otros carbohidratos expresados en el cerdo son el ácido N-glicolneuramínico -*Neu5Gc*- y el *Sda*, cuya anulación, mediante tecnología *CRISPR-Cas9*, junto al primero proporciona cerdos *TKO -triple knockout-*, aptos para implante humano pero no en primates.

La unión anticuerpos- células porcinas activa la cascada del complemento (C') pero la expresión de las proteínas reguladoras del C' protegen las células del huésped contra la lesión causada por el C' activado. El gen regulador de estas proteínas (CD55), factor del deterioro acelerado-, específicas para cada especie, fue introducido en el genoma de cerdo, mostrando que el rechazo se atenuaba y se difería en el tiempo⁷. Este hallazgo sirvió para alertar sobre la importancia de las modificaciones en el donante y no sólo el condicionamiento del receptor, como forma de conseguir la supervivencia prolongada del injerto tras el X-Tx.

La inmunosupresión tradicional a base de ciclosporina mostró su falta de eficacia en primates tras el X-Tx de injerto porcino. Sin embargo, el bloqueo de la vía de activación para linfocitos T, CD40, sí previene una respuesta inmune, y el más reciente CD154, previniendo la trombogénesis. La microangiopatía trombótica, observada

en primates tras X-Tx de cerdo, suele acabar en una coagulopatía de consumo, de desenlace fatal. No obstante, el trabajo de *Iwase* y col⁸ llevó a producir cerdos capaces de expresar una ó más proteínas humanas reguladoras de la coagulación - TBM (trombomodulina)-, EPCR (receptor de la proteína endotelial C), inhibidor del factor tisular-, desarrollando uno de los elementos fundamentales para la utilización de cerdos como xeno-donantes.

Igualmente importante fue el reconocimiento de una respuesta inflamatoria sistémica del huésped en el X-TxC cerdo-babuino, y la posibilidad de disminuirla mediante la inserción de un gen anti-inflamatorio -hemeoxigenasa-1, HO-1- en el genoma porcino⁹.

Cuáles deben, por tanto, ser las modificaciones génicas del cerdo para ser un donante válido de injerto cardíaco humano? El actual conocimiento de la materia plantea que deben anularse los genes de carbohidratos responsables de la respuesta inmunitaria aguda -TKO-, debiendo insertarse proteínas reguladoras del C' humano -CD46 y CD55-, proteínas reguladoras de la coagulación humana - TBM y EPCR-, proteína antiinflamatoria -HO-1-, y el inhibidor de macrófagos CD47 (fig. 1).

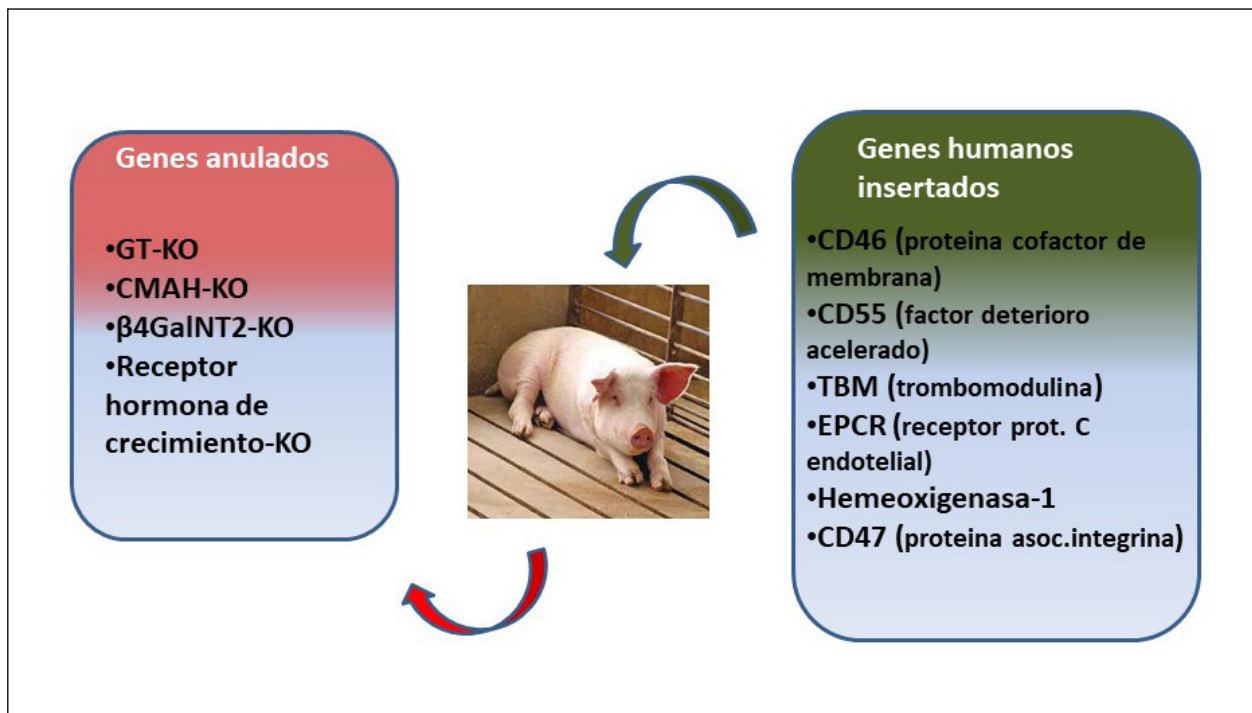


Figura 1. Genotipo del cerdo transgénico utilizado para Xeno-Trasplante cardiaco en la Univ. Maryland, Baltimore, EEUU, 7 enero 2022 (ref. #10)

Estado actual del xeno-Trasplante cardiaco

En enero 2022, el grupo de la Universidad de Maryland realizó el X-TxC con mayor supervivencia hasta el momento. El paciente, con insuficiencia cardiaca terminal, había sido desestimado para TxC y asistencia mecánica permanente, sobreviviendo gracias a la oxigenación de membrana extracorpórea. La indicación de “uso compasivo” fue aplicada y el paciente recibió el injerto de un cerdo génicamente modificado, en 10 genes (ver arriba) logrando una lenta recuperación hasta su deterioro irreversible y muerte, 2 meses después¹⁰.

Las modificaciones génicas en el cerdo donante fueron varias e importantes (*Revivacor*^{RM}, Blacksburg, VA, EEUU). En primer lugar, se anuló el gen de la galactosiltransferasa α 1,3 (GTKO), responsable del rechazo hiperagudo en humanos; también se anularon los cofactores CD46, CD55 y CD59, responsables respectivamente, de las *proteínas de membrana*, del factor de *deterioro acelerado* y de la *proteína inhibidora del complejo atacante de membrana*. Y se introdujeron en el genoma del cerdo genes humanos antitrombosis, en prevención de la microangiopatía trombótica, así como medicación inmunomoduladora para reducir la población linfocítica. Igualmente relevante fue el método de preservación miocárdica utilizado, mediante perfusión *ex vivo* del órgano después de la extracción. Existe evidencia de que la tradicional preservación estática a base de asistolia fría por cardioplejia podría no ser suficiente en el modelo de X-TxC de origen porcino, con cerdos GTKO/hCD46/hTBM (trombomodulina), a juzgar por

las experiencias previas en primates¹¹, donde el riesgo de disfunción peroperatoria del injerto sería superior a 50%. El grupo de *Steen* y col. estableció un protocolo de preservación del injerto cardiaco en un modelo de alo-TxC porcino ortotópico, incluyendo la extracción cardiaca 24 h después de la muerte y preservación del corazón otras 24 h. El líquido de perfusión, a 8°C, era albúmina hiperoncótica, con adrenalina, noradrenalina, tiroxina, cortisol y cocaína diluida¹², en un contenedor apto para transporte aéreo. Las mediciones de función cardiaca, gases arteriales, perfusión renal y respuesta hemodinámica a inotrópicos fueron satisfactorias, apoyando esta estrategia de preservación del xenoinjerto en el modelo cerdo-humano. Una variante de este método fue empleada en el X-TxC de la Univ.de Maryland. Como novedad en el régimen inmunosupresor, el paciente fue tratado con la droga experimental KPL-404, capaz de inhibir la interrelación linfocitos T y B mediante bloqueo de CD40, reduciendo la tasa de anticuerpos anticerdo.

Son significativas las mejoras introducidas en la supervivencia del xenoinjerto porcino a babuino gracias a la ingeniería genética, a corto -rechazo hiperagudo- y medio plazo -rechazo celular -. Asociando terapias inmunomoduladoras - globulina antitimocítica, corticoides, mofetil micofenolato, rituximab- el grupo de *Mohiuddin* ha conseguido una supervivencia del injerto heterotópico y el huésped superior a 12 meses¹³, obteniendo una reducción de la apoptosis mediada por el factor de necrosis tumoral, del daño por isquemia-reperfusión y la microangiopatía

desencadenante de la coagulopatía de consumo¹⁴. El mismo autor empleó terapia anti- CD40/CD154 neutralizadora de la coactivación linfocítica T y B en babuinos receptores de injerto cardíaco proveniente de cerdos GTKO, hCD46, hTBM, llegando a una supervivencia de 2 años¹⁵ y abriendo una vía de aplicación clínica que afiance el X-TxC de cerdos transgénicos.

Transmisión de patógenos

La amenaza de una zoonosis transmitida a través del injerto de cerdo es un riesgo en el X-TxC, como nos recuerdan experiencias anteriores, tales como el SIDA, o las fiebres aviar -A/ H5N1- y porcina -A/H1N1- y como evidencian los hallazgos de *citomegalovirus* y *herpesvirus*, ambos encontrados en cerdos. Por otro lado, los retrovirus endógenos de origen porcino - PERV- están presentes en el genoma del cerdo y no parece segura su erradicación a pesar de los actuales métodos de cría y establecimiento. Existen tres tipos de PERV, A-, B- y C-, siendo este último el de mayor carga infecciosa. Sin embargo, sólo algunos tipos celulares presentan receptores de membrana para PERV y sucumben a la infección. La tecnología CRISPR/Cas9 parece útil y efectiva en la inactivación de estos virus, concretamente la línea PK15, que estaría libre de reinfección por PERV.

Cuestiones éticas ligadas al xenotrasplante

La escasez de datos reales hace difícil un juicio crítico sobre la ética de este tipo de Tx. Puede que algunos receptores lleguen incluso a cambiar su autopercepción¹⁶, sabiéndose portadores de un órgano proveniente de un animal, además de las restricciones sexuales y sociales que impone el X-Tx. En efecto, el modelo de consentimiento informado para el receptor de un corazón de cerdo incluye serias limitaciones a sus relaciones sexuales -que, en el caso de Maryland, debían ser informadas a sus médicos- así como salidas y reuniones sociales, todo en prevención del riesgo de una transmisión de alguna zoonosis. Por tanto, acceder a un X-Tx tendría una carga contractual a tiempo indefinido, y de la que no podría desligarse -caso del X-TxC- o hacerlo con un riesgo -X-Tx renal-.

Desde un punto de vista deontológico, podría plantearse el debate sobre los derechos de los animales, considerados como similares a los humanos por algunos grupos -*People for the Ethical Treatment of Animals (PETA)*- , y en algunos países. Consecuentemente, el utilitarismo que lleva al beneficio de un humano mediante el sacrificio animal estaría sujeto al dilema de un fin justificando todos los medios, pues es evidente que los cerdos transgénicos están sujetos al aislamiento, monitorización y demás controles, asociados a su peculiaridad. Todo ello, sin contar con los posibles efectos adversos que pudieran probarse debidos a su alteración génica. También existen

conflictos religiosos, ya que las religiones islámica y judía prohíben la carne de cerdo, considerada haram/ kosher, aunque contemplan alguna excepción cuando se trata de salvar una vida humana¹⁷. Para los cristianos, el X-Tx podría ser considerado como una ayuda al necesitado, ya que Jesús predicó la rehabilitación física, espiritual y social del individuo apartado por su condición, de cualquier tipo. Confesiones religiosas, tales como los católicos, metodistas, evangélicos y luteranos, aceptan sin problema el uso de alo- y xeno-injertos, mientras que los testigos de Jehová y Santos de la iglesia de Jesucristo de los Últimos Días permiten una decisión a nivel individual¹⁸.

Varias preguntas necesitarán respuestas antes de que un programa clínico de X-TxC tenga éxito. 1) Qué tipo de candidatos son idóneos para un X-TxC? Los pacientes de grupos A y O, los más frecuentes en España, tienen una perspectiva de espera prolongada, especialmente si su situación es estable. Con una mortalidad en lista de espera en torno a 8-10% y el riesgo de ser excluidos más adelante por co-morbilidades subyacentes, podrían considerar la alternativa del X-Tx antes de su deterioro clínico si no son orientados a una asistencia ventricular permanente. 2) Cuáles son exactamente las modificaciones génicas a efectuar en el cerdo para utilizar el corazón como injerto humano? Descritos los genes que expresan los azúcares (*vide supra*) responsables del rechazo precoz, parece que las inserciones de genes humanos de expresión vascular, TBM y EPCR, más los relativos al C' -CD46/ CD55- y antiinflamatorio y activador de macrófagos -HO-1 y CD47, respectivamente- serían suficientes para lograr la supervivencia a medio plazo. 3) Cuál será el régimen de inmunosupresión y seguimiento adecuados? Por lo visto en el caso de Maryland, la anulación de CD49/ CD154 parece el camino a seguir, y el calendario de biopsias, similar al del TxC convencional. 4) Cómo se hará la prevención de infecciones? El propio genoma del cerdo contiene los PERV, no completamente anulados a pesar del aislamiento y vigilancia exhaustivos. Otros patógenos más frecuentes han sido retirados antes de la extracción cardíaca.

2. BIOIMPRESIÓN CARDIACA

2.1. Ingeniería celular con soporte estructural

Un corazón humano posee alrededor de 6 billones de células, de las que un tercio corresponden a cardiomiocitos, y el resto, a células endoteliales, fibroblastos y tejido de conducción, como las fibras de Purkinje. Existe, además, una trama de soporte formada por vasos, tejido muscular liso y estructuras nerviosas, y todo ello embebido en una matriz extracelular-ECM- consistente en polisacáridos, proteoglicanos y azúcares de alta complejidad, englobando una red de proteínas en forma de fibras de colágeno y elastina. Gracias a este andamiaje estructural, puede el corazón realizar y coordinar su actividad eléctrica y mecánica.

En el corazón humano, la despolarización de los cardiomiocitos se asocia a la acumulación intracelular de Ca^{2+} , llevando a la contracción ventricular. Esta secuencia electro-mecánica supone una compleja y variante configuración espacial de la ECM, todo un reto para la bioingeniería cardiaca, y en cuya resolución puede resultar muy útil la Bioimpresión Aditiva 3D, gracias a su capacidad de impresión simultánea con distintos tipos de células siguiendo una configuración topográfica concreta.

Estructuras de soporte y repoblación celular

La idea inicial es fabricar un corazón con repoblación celular del propio paciente a partir de un órgano, humano o animal, previamente vaciado de su componente celular nativo, y reteniendo sus propiedades biomecánicas. El armazón, desceldularizado, es el soporte apropiado para nuevas poblaciones celulares, con su necesario aporte de O_2 y nutrientes, puesto que retiene su estructura vascular y flujo metabólico¹⁹. Además, la exclusión del tejido nativo suprime la carga alógena, o xenogénica en el caso de un corazón de cerdo, responsable de la respuesta inmune, obviando la necesidad de un régimen inmunosupresor. Es cierto que, en el X-TxC porcino el gen que expresa α_1 -1-3 galactosa endotelial provoca una reacción de rechazo hiperagudo, y por tanto, debe ser anulado, como parte de las modificaciones génicas necesarias previas al implante. También podrían utilizarse con este fin los corazones de calidad marginal o provenientes de cadáveres, aunque en este caso, su recuperación biomecánica sería dudosa, ya que la ECM puede haber quedado dañada de forma irreversible.

Las estructuras de soporte sintéticas también pueden utilizarse con este mismo fin pero el nivel de complejidad de la ECM cardiaca es difícilmente reproducible en laboratorio. La vascularización, por ejemplo, es uno de los principales problemas en lo que respecta al uso de biomatrices sintéticas, ya sean de ácido poliláctico -PLLA- ó ácido poliglicólico -PLGA-, pues en ningún caso llegan a reproducir la fuerza tensil del miocardio humano²⁰. Por otro lado, la ECM puede reforzarse con algún hidrogel, -biopolímero hidrofílico reforzado con un 30% de contenido acuoso-, aunque su fuerza mecánica y capacidad de retención celular resulten subóptimas. Por tanto, no resultan aconsejables para la construcción de un soporte estructural apropiado en la "construcción" de un corazón. Cuál sería el andamiaje adecuado? El laboratorio *Badylak* desarrolló en 2005 la técnica para desnudar la ECM de su ropaje celular²¹. Existen procedimientos físicos -ciclos de congelación y descongelación-, químicos -SDS, sulfato docetil sódico- y enzimáticos -digestión con tripsina- para la desceldularización, aunque el que ha mostrado mayor eficacia es el basado en perfusión coronaria de SDS al 1%, seguida de lavado con agua desionizada y solución Triton X 100 al 1%. El remanente se lava con solución buffer de fosfato, antibiótico y proteasa, dejando una ECM libre de carga antigénica y lista para la siembra celular²² (fig. 2).

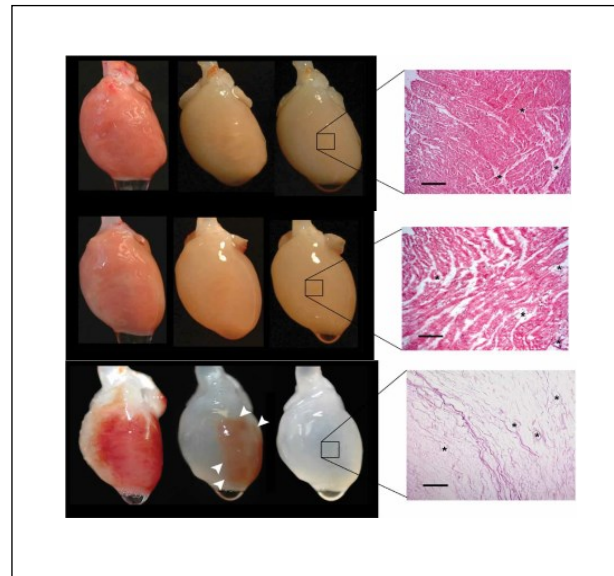


Figura 2. Desceldularización en corazón de rata. Retroperfusión con polietilenglicol (panel superior), Triton - X - 100 (panel medio) y SDS- sulfato docetil - Na^+ (panel inferior). Tinción H&E: mantenimiento de células y núcleos (arriba), parcialmente (medio) y ausentes (abajo). Red arterial (marcado *) conservada. Mod. de Ott HC y col. *Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart* Nat Med 2008; 14 [2]:213-21

Son varias las fuentes celulares posibles para su cultivo. Las células madre embrionarias -ESC-, mesenquimales -MSC-, células madre de médula ósea o del tejido adiposo son válidas, así como células madre pluripotentes inducidas -iPSC-, si bien en este caso aumenta el riesgo oncogénico de teratomas²³. Recordemos que los mecanismos reguladores del crecimiento son similares para las células madre y las células tumorales, incluyendo la proliferación sostenida y su inmunidad a la apoptosis. La siembra celular se hace por perfusión coronaria lo que se conoce como re-entotelización, e inyección intramiocárdica²⁴, aunque el mayor inconveniente con la repoblación celular es la falta de homogeneidad, llevando a la trombogénesis y arritmogénesis. Tras la siembra celular, la estructura de soporte debe cultivarse en un biorreactor con control de pH, temperatura y adecuadas condiciones de flujo y presión de O_2 y nutrientes. Durante esta fase, el cultivo celular se somete a cambios de flujo pulsátil, alineamiento de fibras y estimulación mecánica, pudiendo comprobar la viabilidad celular y composición bioquímica mediante sondas, manteniendo estéril el medio. El producto final genera cierta fuerza contráctil y respuesta a fármacos y cambios electrofisiológicos, pero sin acoplamiento sincrónico de la contracción. Aunque la terapia celular resulte probadamente eficaz en el tratamiento de las enfermedades hematopoyéticas, debe recordarse que su eficacia resulta subóptima cuando se trata del manejo de la insuficiencia cardiaca congestiva, como atestiguan algunos estudios (*Dream-HF*²⁵ - con MSC - y *Concert-HF*²⁶ -MSC combinadas con células

madre cardiacas-) que muestran las limitaciones de esta vía terapéutica en el caso del corazón. Éstas incluyen una efectividad limitada al corto-medio plazo, inferior a los 5 años, falta de raigambre con tendencia a la emigración celular a otros órganos y escasa tasa de supervivencia *in vivo*.

No obstante las barreras mencionadas, Li y col²⁷ han propuesto ingeniosas soluciones en modelos murino y porcino. Para aumentar su especificidad, las células madre pueden marcarse con *ferumoxitol*, y provocar su atracción focal mediante un campo magnético externo. Y en cuanto a la tasa de supervivencia, las células pueden encapsularse en un hidrogel termosensible -ácido acrílico polisopropilacrilamida- con carga electronegativa, mejorando la retención celular, reduciendo su tasa de apoptosis y aportando factores angiogénicos. La inyección de cardiomiocitos y demás células no especializadas - fibroblastos, muscular liso, endotelio- en relación 1:1, parece producir sarcómeros más elongados, con mejor contractilidad y más semejantes a los cardiomiocitos humanos, según han demostrado Tiburcy y col²⁸, reforzando la idea de las iPSC como fuente celular válida.

2.2. Impresión aditiva 3D

Historia y evolución

El proyecto de “fabricar” un corazón en el laboratorio a partir de precursores celulares y sintéticos es el santo grial de la ingeniería tisular, de la mano de los avances en Biología celular, ciencia de Biomateriales y la Ingeniería Mecánica. La impresión 3D, o

Bioimpresión Aditiva 3D (BIA3D) es un proceso de bioingeniería que puede definirse como la producción de estructuras mediante la transferencia de diseños por ordenador, para generar biomateriales con un patrón tridimensional³¹.

La primera descripción de biofabricación por impresión aditiva fue en los años 80, y aplicable sobre todo a la industria aeroespacial, del automóvil y la construcción. La técnica fue aplicada al campo de la salud para la creación de modelos-guía en la separación de gemelos univitelinos y en la reparación quirúrgica de cardiopatías congénitas, y posteriormente, en la fabricación de material protésico para reparación craneal y esternal. El gran avance de la BIA3D es consecuencia de los nuevos diseños por ordenador, capaces de convertir grandes bases de datos en un lenguaje reconocible por las bioimpresoras de alta resolución, imprimiendo células vivas y materiales plásticos (fig. 3). Así, el paso de *impresión 3D* a *BIA3D* se basa en el reconocimiento de los tejidos como estructuras tridimensionales, con una arquitectura mixta de células y ECM que puede replicarse en el laboratorio. De hecho, los primeros trabajos de Boland³², basados en la biotinta celular, ya planteaban algunas de las cuestiones prácticas actuales, como la densidad celular óptima y las cualidades del hidrogel acompañante. Pronto surgiría el reto de bioimprimir órganos humanos, especialmente, el corazón.

Son tres los pilares fundamentales de la BIA3D. En primer lugar, la íntima colaboración de ingenieros, cirujanos y biólogos en cada laboratorio, unidos en la resolución de complejos problemas técnicos y médicos. El 2º componente lo constituyen las células -cualquier tipo de células humanas- y biomateriales -con las propiedades biomecánicas de la

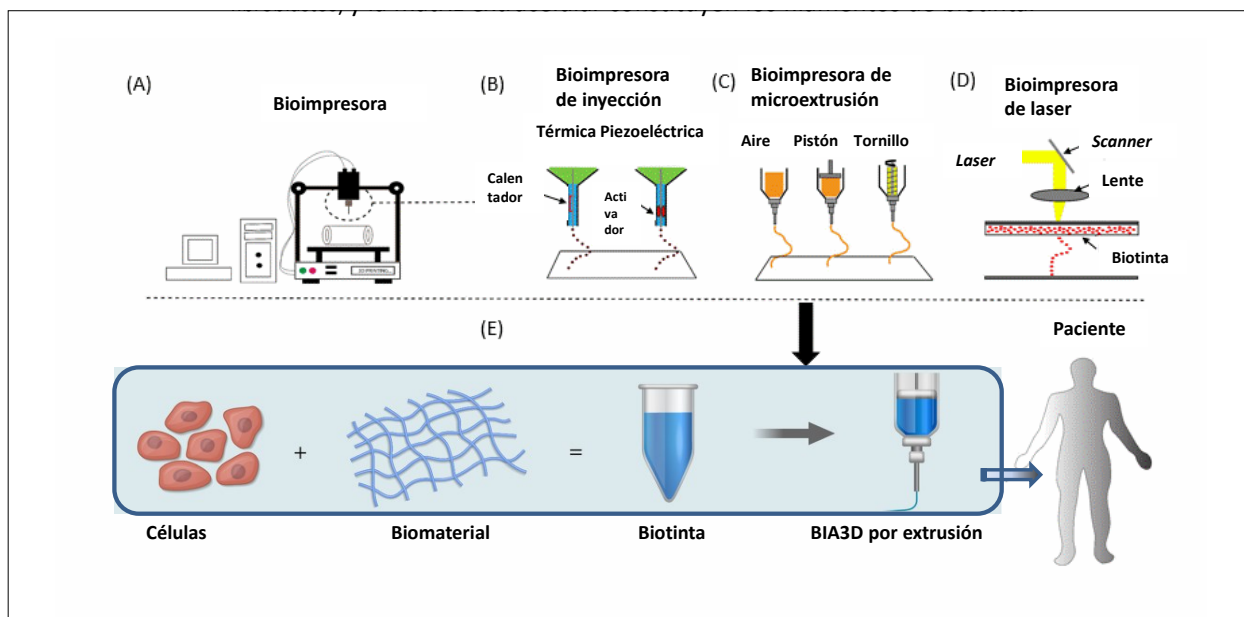


Figura 3. Representación esquemática de bioimpresoras.

Proceso de bioimpresión aditiva3D: las células (cardiacas, endoteliales, musculares lisas y, fibroblastos) y la matriz extracelular constituyen los filamentos de biotinta.

Mod. de Bioengineering 2021, 8, 133 y APL Bioeng. 2020 4, 010903

ECM de soporte-. Finalmente, los biorreactores – dispositivos especiales que replican la maduración y desarrollo fisiológicos por estímulos electro-mecánicos, térmicos y de flujo-, que definen las diversas aplicaciones del producto biofabricado³³.

Bioimpresión aditiva 3D del corazón

La producción de un corazón mecánicamente activo se ha hecho mediante descelularización del corazón de rata y posterior repoblación con miocitos³⁴ o células madre pluripotentes desarrolladas y diferenciadas. Invariablemente, en todos estos casos, la presión generada por el ventrículo izquierdo oscila en torno a 1 mmHg, reflejando la disparidad existente entre estructura y función del corazón así fabricado.

Recientemente, Noor y col.de la Universidad de TelAviv, publicaron la primera BIA3D de un corazón, en realidad, un cardioide, por sus peculiaridades biológicas y mecánicas³⁵. A partir del tejido adiposo del propio paciente se extrajeron células para su reprogramación en iPSC, y posterior diferenciación, en cardiomiocitos y células endoteliales. Ambos tipos se combinaron con hidrogel para formar la biotinta con que fabricar el parénquima cardiaco y la red vascular, respectivamente, obteniendo el producto final, de 20 x 14 mm de tamaño (fig.4). El resultado, un pequeño corazón perfundido y móvil, pero carente de una contracción isocrónica y mucho menos, de bombear sangre con latido efectivo. Unos meses más tarde, el grupo de la Universidad Carnegie Mellon, en Pittsburgh, aplicó la técnica FRESH –Freeform Reversible Embedded Suspended Hydrogels- para imprimir corazones autoperfundidos de distintos tamaños³⁶,

aunque sin conseguir replicar la función completa. El importante avance que supuso la impresión del primer corazón no deja de ser un intento de replicar el órgano en su función, si bien no se pudo demostrar ni la organización celular ni arquitectura de las miofibras propias de la estructura cardiaca. No obstante, muestra la posibilidad real de bioimprimir corazones trasplantables, asociando los factores de transcripción (octubre ¾, Sox2, c-Myc y Klf4) fundamentales para reprogramar fibroblastos cutáneos a su estado embrionario³⁷, las llamadas células madre pluripotentes inducidas –iPSC-. La importancia de este descubrimiento,, quedó confirmada posteriormente, al mostrar la posibilidad de reconvertir las iPSC en casi cualquier tipo celular del cuerpo, incluyendo cardiomiocitos plenamente funcionales³⁸.

El proceso real de BIA3D comienza con la adquisición de imágenes (cardio-RM, angio-TAC y ECO) para generar un modelo por ordenador. Las células autólogas se obtienen de una biopsia cutánea, en la que se aíslan los fibroblastos, y se reprograman como iPSC capaces de convertirse en cualquier tipo celular humano, incluyendo cardiomiocitos y células musculares lisas, y en situación ideal, células endoteliales y del tejido de conducción. Los elementos celulares reprogramados, junto con el soporte de biomateriales –hormonas, factores de crecimiento, biopolímeros- constituyen la biotinta específica que se carga en jeringas, produciendo los filamentos biosintéticos que formarán, capa a capa, el futuro corazón. El órgano así impreso se cultiva en condiciones estáticas y después pasa a un biorreactor, donde se condiciona bajo estimulación eléctrica y mecánica. El producto final resulta isogénico con el paciente y no necesita, por tanto, de terapia inmunosupresora.

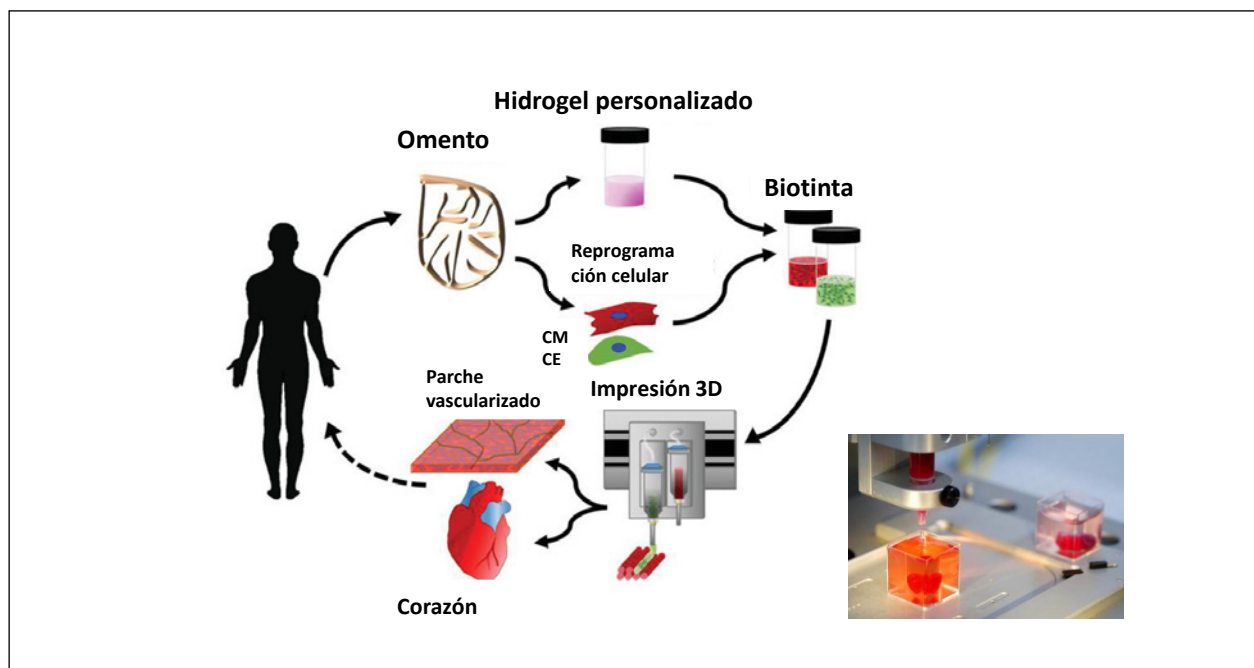


Figura 4. Impresión 3D personalizada de parches y corazón vascularizados*.
*Mod.de Adv.Sci.2019, 6 DOI: (10.1002/adv.201900344

Para la biofabricación del **músculo cardíaco** se están empleando cardiomiocitos a partir de células madre, quedando integrados junto con la microcirculación y tejido de conducción, según una determinada configuración espacial durante el proceso de impresión. La producción de parches cardíacos con vascularización propia servirán para reparar complejas cardiopatías congénitas en los pacientes pediátricos, con potencial de crecimiento a medida del corazón nativo. No obstante, la integración y funcionalidad de estos tejidos provenientes de BIA3D son, por ahora, desconocidas.

El punto de partida en la construcción de **las válvulas cardíacas** es la propia anatomía del tejido valvular natural, tratando de replicar sus propiedades biomecánicas⁴³. Con el imparable avance de las técnicas percutáneas, es posible vislumbrar un futuro en que la reparación/ reemplazo valvulares sean mínimamente invasivos, incorporando la BIA3D para fabricar válvulas a bajo coste, en el mismo acto médico y totalmente personalizadas en cada caso (fig. 5). Queda por dilucidar si la bioimpresión valvular será simultánea con el resto de tejidos cardíacos –altamente compleja– o serán incorporadas de forma robotizada al final del proceso.

La BIA3D del **tejido de conducción** eléctrica resulta más complicada, no sólo en las células de descarga del nodo sinusal y A-V sino también en las altamente especializadas fibras de Purkinje. El tratamiento de arritmias con terapia celular presenta

resultados mediocres⁴⁴, si bien el impacto clínico de la BIA3D será, probablemente, limitado al implante de grupos celulares capaces de despolarización eléctrica (*enfermedad del nodo sinusal, síndrome de QT alargado*). Algunos modelos microfisiológicos 3D –corazón en chip– para el tejido cardíaco incluyen células especializadas provenientes de pacientes genéticamente predispuestos a trastornos de conducción, lo que supone un auténtico banco de pruebas *in vitro* para el estudio de determinadas arritmias y desarrollar fármacos cardioactivos. La biotinta empleada en este tipo de impresión aditiva deberá contener poblaciones celulares modificadas de tejido muscular, pero la idea actual es reprogramar iPSC a progenitores cardiocelulares para su posterior modificación en células marcapaso y células conductoras de la despolarización⁴².

El problema de la micro- y macro-vascularización del corazón

El mayor obstáculo en la biofabricación del corazón reside en su pared ventricular, ya que resulta difícil construir un sistema microvascular competente para un espesor > 500µm. La bioimpresión de parches tisulares *ad hoc*, con la medida exacta y adecuada relación tensión-deformación, puede ser útil en casos de reconstrucción ventricular parcial³⁹, pero el tamaño de los cilindros de biotinta excede las dimensiones de capilares, vénulas y arteriolas para

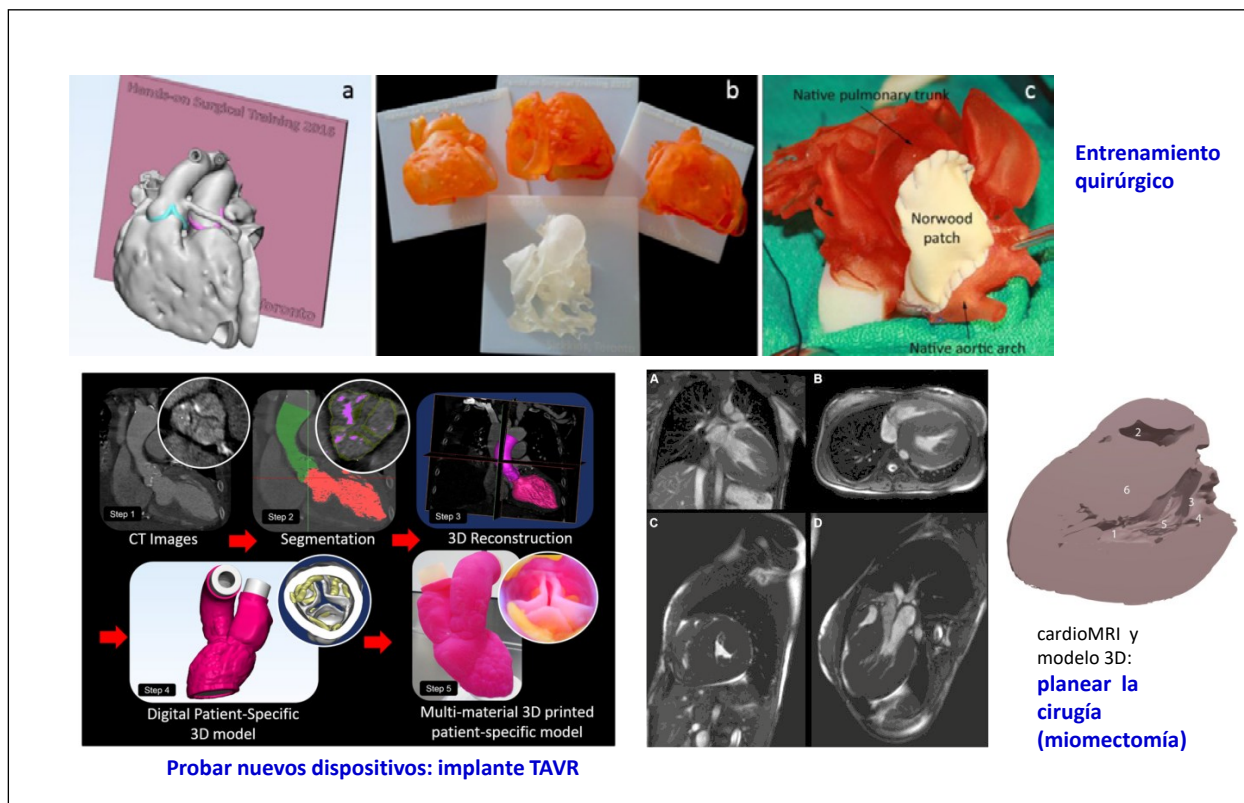


Figura 5. Aplicaciones. Impresión cardíaca 3D. Vukicevic y col. *Cardiac 3D printing*. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2017 February ; 10(2): 171–184. *Hi-fi 3D CAD of HCM*. *CASE (Phila)*. 2022 Oct; 6(8): 350–354 *TAVR*. *Trans aortic valve replacement*

un espesor amplio, homogéneo y compacto como el humano. El proceso de impresión debe completarse con el de angiogénesis, para dotar al sistema de funcionalidad, y sigue siendo el mayor reto en este campo. Sin embargo, *Chang y Boland*⁴⁰ han conseguido imprimir segmentos microvasculares a partir de células derivadas del tejido graso junto a microestructuras vasculares cultivadas *in vitro*. Cuando estas estructuras son implantadas en tejido nativo la microcirculación del segmento trasplantado se anastomosa con el propio, marcando un posible camino para solventar el problema. En la tecnología de descelularización-repoblación celular, la estructura de soporte (fig.2) ya contiene la red vascular propia, pero en cualquier caso, aún no se ha conseguido replicar la complejidad de la red vascular en el corazón humano.

El modelo de la arteriosclerosis coronaria ha suscitado la búsqueda de conductos vasculares endotelizados con células autólogas, tratando de reducir el riesgo de trombosis que constituye el talón de Aquiles de los injertos sintéticos⁴¹. La BIA3D con microesferas (Fig.3) ha producido microconductos vasculares, que, sometidos luego a proceso de maduración, muestran mejor biocompatibilidad y permeabilidad, aunque su preparación tarda unas 8 semanas y no resulta, por el momento, indicada desde un punto de vista clínico⁴². Un aspecto interesante de la impresión aditiva es la posibilidad de construir estructuras redundantes, p.ej. arterias coronarias, ausentes en el corazón humano natural. Así, la oclusión de un territorio coronario que conlleva el infarto de miocardio subsiguiente, podría prevenirse mediante una red coronaria supletoria –equivalente a la circulación colateral en la oclusión crónica- para mantener la viabilidad del músculo en situaciones de hipoaflujo.

3. MANIPULACIÓN GÉNICA Y TERAPIA CELULAR

Introducción

El descubrimiento de las células madre pluripotentes –iPSC- por *Gurdon* abrió las puertas a una revolución en el campo celular, mostrando que el núcleo de una célula intestinal madura de rana podía reprogramarse a un estado pluripotente⁴⁵. En 2006, *Yamanaka* y *Takahashi* ampliaron el descubrimiento al describir cuatro factores de transcripción responsables de la reprogramación de células maduras en iPSC⁴⁶, hallazgo merecedor del Nobel de Medicina, compartido con *Gurdon*, al combinar los progresos con células madre y la manipulación génica (MaG).

Concretamente, el descubrimiento de *CRISPR* (*clustered regularly interspaced palindromic repeats*) y la proteína asociada, *CRISPR-Cas9*, ha transformado el mundo de la biología molecular, convirtiéndose en una herramienta indispensable en la manipulación de cualquier genoma⁴⁷. La edición génica no está exenta de riesgos, como la carcinogénesis y la infección, pero permite modular la

respuesta inmune al implante celular o del órgano producidos a partir de iPSC, ya sean autólogas, de donantes universales o provenientes de la MaG.

Tipos celulares pluripotentes

Las iPSC **autólogas** plantean la oportunidad de diseñar injertos libres de rechazo⁴⁸, aunque el coste a nivel de personal y el tiempo requerido para generar suficiente cantidad de células impiden, de momento, su uso para Tx inmediato. Sin embargo, si el plazo temporal es previsible, puede fabricarse un injerto –biológico o biomecánico- cardíaco único, como han demostrado en un elegante estudio *Konstantinov* y col⁴⁹, para pacientes pediátricos con corazón izquierdo hipoplásico.

Puede ampliarse la capacidad de elección mediante la creación de un biobanco universal con donantes seleccionados, por compatibilidad de haplotipo HLA (antígenos humanos leucocitarios). Las iPSC provendrían de **donantes homocigóticos** para los tipos más frecuentes de cada población, sabiendo que el tamaño de la muestra aumenta con la diversidad étnica, aunque siempre puedan existir intercambios entre los distintos laboratorios.

Y, por supuesto, la **MaG** puede generar iPSC con especificidad de alelos a partir de **donantes heterocigóticos**⁵⁰, convertidos en pseudo-homocigóticos. La necesidad de inmunosupresión sería menor y por menos tiempo, ya que la variedad de antígenos menores de histocompatibilidad existe incluso en presencia de coincidencia HLA. La tecnología *CRISPR* puede usarse para suprimir el clásico HLA clase I (HLA-A, -B y -C), interfiriendo el *gen β2-microglobulina*, con lo que las iPSC podrían evitar las células-T citotóxicas pero no las NK (*natural killer*) ni el riesgo oncogénico. Es preferible anular HLA-A y HLA-B pero reteniendo el alelo HLA-C, pues su presentación inhibe también la actividad de células NK y reduce los riesgos de carcinogénesis e infección⁵⁰. Otra estrategia consiste en inducir una cobertura inmune mediante *CRISPR-Cas9*, para inhibir la reacción de rechazo a iPSC alogénicas⁵¹.

Aplicaciones clínicas

La forma más sencilla de aplicación es la inyección intramiocárdica de las células madre, que se asocia a una respuesta inmune, posible provocadora de la subsiguiente mejoría funcional⁵². Por tanto, existen dudas razonables de que el beneficio observado sea debido a la terapia y diferenciación de las células madre y no a un mecanismo inmunológico, aunque actualmente hay estudios en fase preclínica para evaluar el posible beneficio de esta vía⁵³. Asimismo, los estudios clínicos en pacientes con cardiopatía terminal e inyección directa de cardiomiocitos derivados de iPSC plantean el riesgo arritmogénico, que ya ha sido descrito en animales⁵⁴.

Por otro lado, no es fácil replicar la anisotropía de los cardiomiocitos, esencial para la función

impelente del corazón. Se han propuesto varios métodos para acelerar su maduración, incluyendo ciclos de tensión-deformación y ECM biopolimérica, y lo cierto es que los parches tisulares derivados de iPSC muestran vascularización y mejora de la función cardíaca⁵⁵. No obstante, fabricar parches de tal espesor muscular (densidad celular $\sim 10^8$ células/ cm^3), manteniendo la geometría estructural cardíaca y capaz de generar fuerza contráctil, suponen un importante reto al que, además se añade la integración de un sistema vascular. Como se ha visto ya (BIA3D, El problema de la micro- y macro-vascularización del corazón), la impresión aditiva 3D ofrece la tecnología para producir estructuras tisulares vascularizadas a partir de iPSC⁵⁶, bien por repoblación celular con cardiomiocitos o progenitores celulares sobre un andamiaje estructural, bien por impresión acumulativa de filamentos celulares. Recientemente, Kupfer y col. han descrito la utilización de hidrogel como ECM para perfundir estructuras cavitadas 3D, con función electromecánica viable⁵⁶, hallazgo empleado por Konstantinov y col. en la fabricación de una biobomba ventricular para pacientes con corazón univentricular⁴⁹. Este diseño permite reducir 10 mmHg la presión venosa central en los casos de enteropatía post-reparación tipo Fontan, mejorando sensiblemente su calidad de vida.

Modificación complementaria de blastocitos: la producción del órgano-quimera

En otra línea de MaG, cabe destacar la creación de quimeras celulares mediante complemento del blastocito de otro animal no humano. El proceso consiste en tomar iPSC humanas, que se inyectan en el blastocito de un animal genéticamente modificado. La manipulación suprime el gen que expresa una determinada línea celular, justo la que produce el órgano que se quiere trasplantar después (fig.6).. Así, el blastocito modificado, con las células iPSC humanas, se implanta en el animal adulto y acaba desarrollando un órgano quimérico, al ser incapaz de esa organogénesis específica.⁵⁷ Con esta técnica se ha generado un páncreas de rata a partir de células madre embrionarias de ratón. Sin embargo, en el caso del corazón, no parece que esta técnica sea viable, por la imposible ausencia total del órgano en el blastocito complementado, con lo que el corazón quimérico sería realmente un híbrido del donante y el receptor humano⁵⁸.

Hasta el momento, se han producido embriones quiméricos de raza humana y porcina y más recientemente con primates, aunque la contribución celular humana es escasa⁵⁹. Por otro

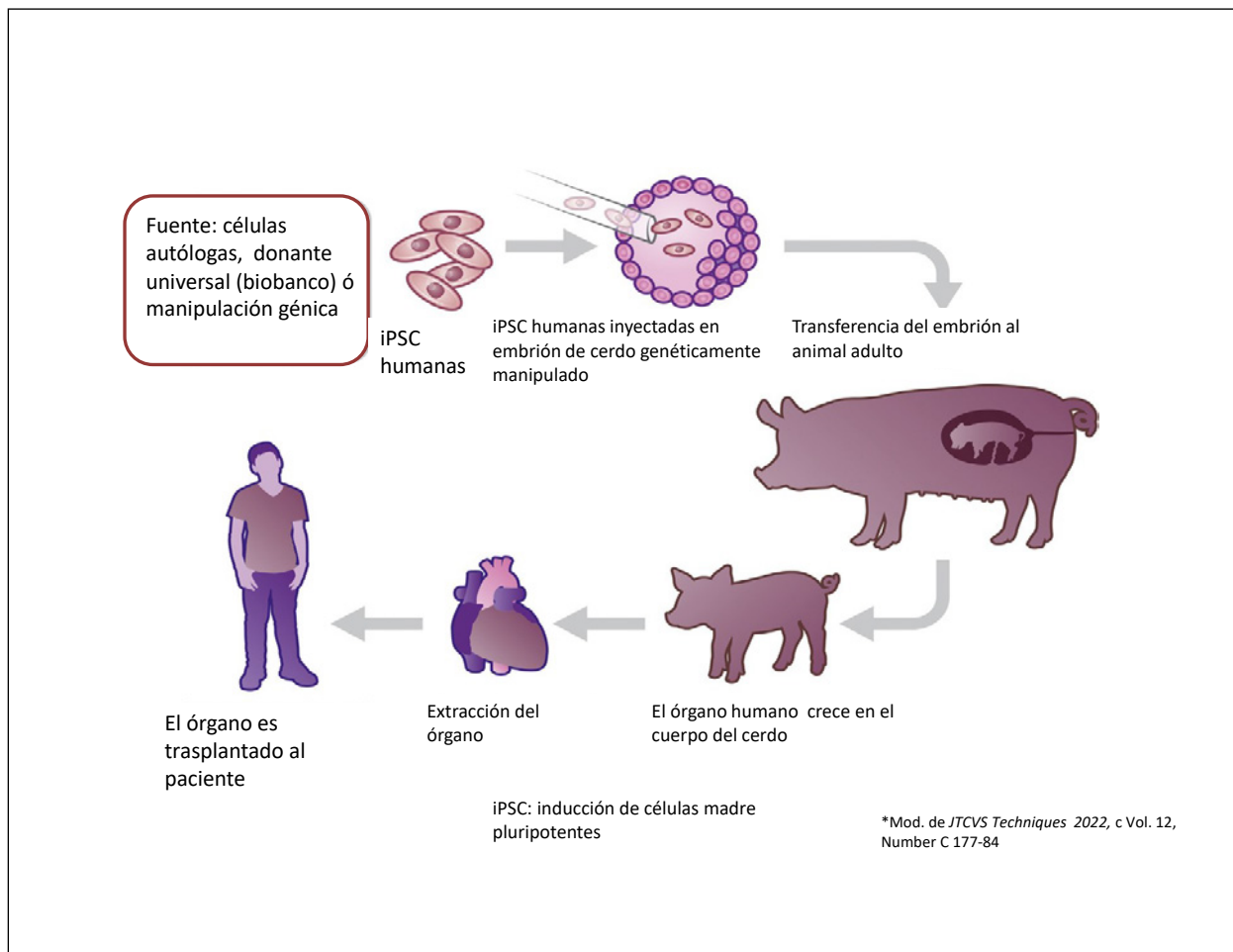


Figura 6. Generación de órganos quiméricos mediante complementación de blastocitos*.

lado, el corazón, y otros órganos producidos a partir de blastocitos complementados, tienen vascularización propia del huésped, lo que prácticamente los invalida para el Tx. Sin embargo, hay evidencia de una quimera porcina con endotelio exclusivamente humano⁵⁷, derivado de iPSC, por lo que en el futuro es plausible la producción de órganos con sistema vascular humano.

Otro aspecto a destacar en el caso de órganos-quimera es la divergencia evolutiva entre las células humanas donantes y el huésped animal elegido, pues la tasa de crecimiento somático es muy diferente entre ambos y con seguridad, también lo será su influencia en la organogénesis⁶⁰. En el ejemplo anterior de los pacientes pediátricos con corazón izquierdo hipoplásico, es posible vislumbrar la producción de un corazón quimérico apto para TxC, pero aun así, se ignora cuál sería el comportamiento de tal órgano y su estado de desarrollo evolutivo a lo largo del ciclo vital del animal⁶¹. Todo ello, sin perder de vista las cuestiones ético-legales asociadas a la producción de embriones mixtos con células humanas, especialmente en lo que se refiere al sistema nervioso y reproductivo⁶². Sin duda, la MaG supone un hito en el campo de los trasplantes en general, y del Xeno-TxC en particular, así como la

posibilidad de fabricar bio-dispositivos intracardiacos a partir de células madre. Sin embargo, resulta difícil vaticinar cuál será su alcance real y el plazo temporal en que estas líneas de trabajo fructifiquen en avances clínicos satisfactorios y permanentes (fig.7).

CONCLUSIONES

La ingeniería genética y las nuevas terapias de inmunomodulación, así como un mejor conocimiento de las compatibilidades y barreras interespecies, han contribuido a afianzar el campo del X-Tx, planteando la posibilidad de establecer un programa clínico para X-TxC. La anulación, en el cerdo, de determinados genes que expresan azúcares causantes del rechazo humoral, abre la puerta a una supervivencia prolongada del injerto, en cuyo genoma se hayan insertado genes de expresión humana para prevenir la microangiopatía y la coagulopatía de consumo.

En la repoblación celular sobre soporte, el primer reto es conseguir un andamiaje biocompatible, resuelto con métodos de descelularización.

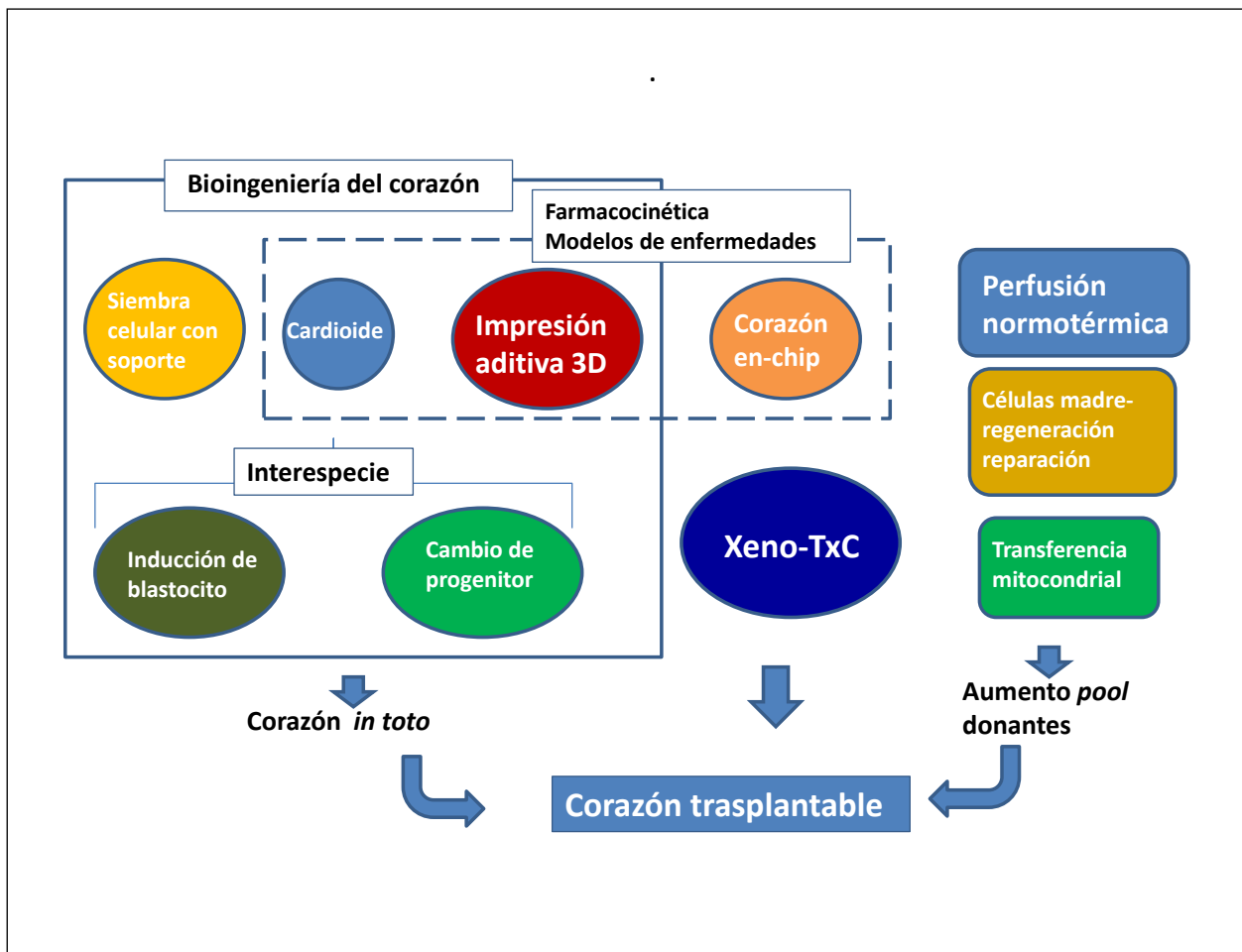


Figura 7. Ingeniería tisular para el corazón

La repoblación celular, con cariotipo estable, también parece resuelta mediante el cultivo de iPSC, pero queda un tercer obstáculo: la siembra celular efectiva de la ECM como estructura de soporte²⁹. Una posible solución reside en la BIA 3D, generando biomatrices con células³⁰, sin que, de momento, se haya conseguido replicar la compleja integridad estructural de la ECM natural. Incluso si se pudiera biofabricar un corazón, el coste actual sería prohibitivo, hasta que su producción a escala permita el uso clínico sin restricciones. Tampoco se conoce la viabilidad a largo plazo de un órgano así fabricado, ni el resultado de la interacción biomatriz-células, sin hablar de un adecuado tejido de conducción, requisito indispensable para evitar trombosis cavitaria y arritmias fatales. Realmente, existe la posibilidad técnica de imprimir un corazón vascularizado, pero otra cosa distinta es remedar la función de una compleja red vascular intramiocárdica y epicárdica, capaz de sobrevenir a las necesidades metabólicas del órgano nativo en distintas situaciones de ejercicio y esfuerzo máximo.

El segundo objetivo de la BIA3D para el corazón es la impresión de áreas miocárdicas suficientemente extensas y conservando las propiedades biológicas y mecánicas originales, especialmente, elasticidad y resistencia. La idea final es que el corazón impreso y autoperfundido, de tamaño humano, tenga capacidad isocontráctil para bombear sangre

La última incógnita sería el riesgo oncogénico asociado al uso de iPSC. Por tanto, aún está lejos la posibilidad real de plasmar las imágenes y datos específicos en un modelo 3D capaz de generar un corazón con las propiedades electromecánicas y fisiológicas adecuadas para ser trasplantado en humanos.

Las perspectivas de ampliar sustancialmente el campo del TxC vienen de la investigación con células madre, iPSC, y la posibilidad de editar el genoma mediante manipulación directa, para conseguir órganos trasplantables. También es probable que puedan biofabricarse órganos, incluyendo el corazón, sin la exigencia de inmunosupresión permanente, con el consiguiente ahorro económico y el beneficio en la calidad de vida del paciente. Estos descubrimientos deberán, necesariamente, ir acompañados de cambios legislativos *ad hoc* permitiendo su aceptación social, si es que terminan por incorporarse al conjunto de estrategias diseñadas para los pacientes con cardiopatía terminal.

DECLARACIÓN DE TRANSPARENCIA

El autor/a de este artículo declara no tener ningún tipo de conflicto de intereses respecto a lo expuesto en el presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Newsletter Transplant. International figures on donation and transplantation. EDQM. Vol.26. Domínguez-Gil B, ed. Strasbourg. ISSN: 2171-4118.
2. Organización Nacional de Trasplantes. Memoria actividad donación y trasplante cardiaco. España, 2021: 1-85.
3. Tandukar S, Hariharan S. Xenotransplantation. *Organogenesis*. 2018; 14(4): 159-162.
4. Hardy JD, Chavez CM, Kurrus FD et al. Heart transplantation in man: Developmental studies and report of a case. *JAMA*. 1964; 188: 1132-1140.
5. Wadiwala IJ, Garg P, Yazji JH et al. Evolution of xenotransplantation as an alternative to shortage of donors in heart transplantation. 2022; 14(6): e26284. doi:10.7759/cureus.26284.
6. Cooper DKC. The long and winding road to clinical xenotransplantation: a personal journey. *Eur Surg Res*. 2022; 63: 165-172.
7. Cozzi E, White DJ. The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans. *Nat Med*. 1995; 1(9): 964-966.
8. Iwase H, Hara H, Ezzelarab M et al. Immunological and physiologic observations in baboons with life-supporting genetically-engineered pig kidney grafts. *Xenotransplantation*. 2017; 24(2): 10.1111/xen.12293.
9. Cooper DKC, Hara H, Iwase H et al. Justification of specific genetic modifications in pigs for clinical kidney or heart xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2019; 26(4): e12516.
10. Griffith BP, Goerlich CE, Singh AK et al. Genetically modified porcine-to-human cardiac xenotransplantation. *N Engl J Med*. 2022; 387: 35-44.
11. Längin M, Reichart B, Steen S et al. Cold non-ischemic heart preservation with continuous perfusion prevents early graft failure in orthotopic pig-to-baboon xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2021; 28(1): e12636. doi: 10.1111/xen.12636.
12. Steen S, Paskevicius A, Liao Q et al. Safe orthotopic transplantation of hearts harvested 24 hours after brain death and preserved for 24 hours. *Scand Cardiovasc J*. 2016; 50(3): 193-200.
13. Mohiuddin MM, Corcoran PC, Singh AK et al. Induction B-cell depletion significantly prolongs survival of GTKO.hCD46Tg pig heart xenografts up to 8 months. *Am J Transplant*. 2012; 12(3): 763-771. doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03846.x.
14. Mohiuddin MM, Singh AK, Corcoran PC, Hoyt RE, Thomas ML, Ayares D, Horvath KA. Genetically engineered pigs and target-specific immunomodulation provide significant graft survival and hope for clinical cardiac xenotransplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2014; 148(3): 1106-1114.
15. Mohiuddin MM, Singh AK, Corcoran PC et al. Chimeric 2C10R4 anti-CD40 antibody therapy is critical for long-term survival of GTKO.hCD46.hTBM pig-to-primate cardiac xenograft. *Nat Commun*. 2016; 7: 11138. doi: 10.1038/ncomms11138

16. Krishna M, Lepping P. Ethics of xeno-transplantation. *BJMP*. 2011; 4(3): a425.
17. Paris W, Jerry R, Seidlery H et al. Jewish, Christian and Muslim theological perspectives about xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2018; 25(3): e12400. doi.org/10.1111/xen.1240
18. Jenkins ED, Yip M, Melman L et al: Informed consent: Cultural and religious issues associated with the use of allogeneic and xenogeneic mesh products. *J Am Coll Surg*. 2010; 210: 402-410.
19. Scarritt ME, Pashos NC, Bunnell BA. A review of cellularization strategies for tissue engineering of whole organs. *Front Bioeng Biotechnol*. 2015; 3: 43. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00043>
20. Breckwoldt K, Weinberger F, Eschenhagen T. Heart regeneration. *Biochim Biophys Acta*. 2016; 1863: 1749-1759.
21. Robinson KA, Li J, Mathison M et al. Extracellular matrix scaffold for cardiac repair. *Circulation*. 2005; 112(Suppl. 9): 135-143.
22. Alexanian RA, Mahapatra K, Lang D et al. Induced cardiac progenitor cells repopulate decellularized mouse heart scaffolds and differentiate to generate cardiac tissue. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2020; 1867: 118559.
23. Mills RJ, Hudson JE. Bioengineering adult human heart tissue: How close are we? *APL Bioeng*. 2019; 3(1): 010901. doi: 10.1063/1.5070106
24. Hillebrandt KH, Everwien H, Haep N et al. Strategies based on organ decellularization and recellularization. *Transpl Int*. 2019; 32: 571-585.
25. Borow KM, Yaroshinsky A, Greenberg B et al. Phase 3 DREAM-HF trial of mesenchymal precursor cells in chronic heart failure. *Circ Res*. 2019; 125(3): 265-281.
26. Bolli R, Hare JM, March KL et al. Rationale and design of the CONCERT-HF Trial (combination of mesenchymal and c-kit(+) cardiac stem cells as regenerative therapy for heart failure). *Circ Res*. 2018; 122(12): 1703-1715.
27. Li J, Hu S, Cheng K. Engineering better stem-cell therapies for treating heart diseases. *Ann Transl Med*. 2020; 8(8): 569. <http://dx.doi.org/10.21037/atm.2020.03.44>
28. Tiburcy M, Hudson JE, Balfanz P et al. Defined engineered human myocardium with advanced maturation for applications in heart failure modeling and repair. *Circulation*. 2017; 135(19): 1832-1847.
29. Hussain MWA, Garg P, Yazji JH, Alomari M, Alamouti-Fard E, Wadiwala I, Jacob S. Is a bioengineered heart from recipient tissues the answer to the shortage of donors in heart transplantation? *Cureus*. 2022; 14(5): e25329. doi: 10.7759/cureus.25329
30. Kałużna E, Nadel A, Zimna A, Rozwadowska N, Kolanowski T. Modeling the human heart ex vivo-current possibilities and strive for future applications. *J Tissue Eng Regen Med*. 2022; 16(10): 853-874.
31. Lee JM, Sing SL, Zhou M et al. 3D bioprinting processes: a perspective on classification and terminology. *Int J Bioprint*. 2018; 4(2): 151. <http://dx.doi.org/10.18063/IJB.v4i2.151>
32. Wilson WC Jr, Boland T. Cell and organ printing 1: Protein and cell printers. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2003; 272(2): 491-496. doi: 10.1002/ar.a.10057.
33. Paez-Mayorga J, Hernández-Vargas G, Ruiz-Esparza GU et al. Bioreactors for cardiac tissue engineering. *Adv Healthc Mater*. 2019; 8(7): e1701504.
34. Hogan M, Mohamed M, Tao ZW, Gutierrez L, Birla R. Establishing the framework to support bioartificial heart fabrication using fibrin-based three-dimensional artificial heart muscle. *Artif Organs*. 2015; 39(2): 165-171.
35. Noor N, Shapira A, Edri R et al. 3D printing of personalized thick and perfusable cardiac patches and hearts. *Adv Sci*. 2019; 6(11): 1900344.
36. Lee A, Hudson A, Shiwarski D et al. 3D bioprinting of collagen to rebuild components of the human heart. *Science*. 2019; 365(6452): 482-487.
37. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126(4): 663-676.
38. Lian X, Zhang J, Azarin SM et al. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/beta-catenin signaling under fully defined conditions. *Nat Protoc*. 2013; 8(1): 162-175.
39. Leblanc AJ, Nguyen QT, Touroo JS et al. Adipose-derived cell construct stabilizes heart function and increases microvascular perfusion in an established infarct. *StemCells Transl Med*. 2013; 2(11): 896-905.
40. Chang CC, Boland ED, Williams SK, Hoying JB. Direct-write bioprinting three-dimensional biohybrid systems for future regenerative therapies. *J Biomed Mater Res B*. 2011; 98(1): 160-170.
41. Kozaniti FK, Metsiou DN, Manara AE, Athanasios G, Deligianni DD. Recent advancements in 3d printing and bioprinting methods for cardiovascular tissue engineering. *Bioengineering*. 2021; 8 (10): 133. <https://doi.org/10.3390/bioengineering8100133>
42. Ravi K, Birla, Stuart K, Williams. 3D bioprinting and its potential impact on cardiac failure treatment: an industry perspective. *APL Bioeng*. 2020; 4: 010903. doi: 10.1063/1.5128371
43. Duan B, Hockaday LA, Kang KH, Butcher JT. 3D bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels. *J Biomed Mater Res A*. 2013; 101(5): 1255-1264.
44. Li G, He X, Sun C. Induced pluripotent stem cell-based therapies for inherited arrhythmias: Opportunities and challenges involved (Review). *Mol Med Rep*. 2015. 11(1): 3-10.
45. Gurdon JB. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol*. 1962; 10: 622-640.
46. Yamanaka S. Pluripotent stem cell-based cell therapy-promise and challenges. *Cell Stem Cell*. 2020; 27(4): 523-531.
47. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012; 337: 816-821.
48. Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y et al. Autologous induced stem-cell-derived retinal cells for macular degeneration. *N Engl J Med*. 2017; 376: 1038-1046.

49. Konstantinov IE, King G, Porrello ER. From genome editing to blastocyst complementation: a new horizon in heart transplantation? *JTCVS Tech.* 2022; 12: 177-184.
50. Xu H, Wang B, Ono M et al. Targeted disruption of HLA genes via CRISPR-Cas9 generates iPSCs with enhanced immune compatibility. *Cell Stem Cell.* 2019; 24(4): 566-578.e7.
51. Rong Z, Wang M, Hu Z et al. An effective approach to prevent immune rejection of human ESC-derived allografts. *Cell Stem Cell.* 2014; 14: 121-130.
52. Vagnozzi RJ, Maillet M, Sargent MA et al. An acute immune response underlies the benefit of cardiac stem cell therapy. *Nature.* 2020; 577: 405-409.
53. Guan X, Xu W, Zhang H et al. Transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes improves myocardial function and reverses ventricular remodeling in infarcted rat hearts. *Stem Cell Res Ther.* 2020; 11(1): 73. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01602-0>
54. Romagnuolo R, Masoudpour H, Porta-Sánchez A et al. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes regenerate the infarcted pig heart but induce ventricular tachyarrhythmias. *Stem Cell Rep.* 2019; 12(5): 967-981.
55. Gao L, Gregorich ZR, Zhu W et al. Large cardiac muscle patches engineered from human induced-pluripotent stem cell-derived cardiac cells improve recovery from myocardial infarction in swine. *Circulation.* 2018; 137(16): 1712-1730.
56. Kupfer ME, Lin W-H, Ravikumar V et al. In situ expansion, differentiation, and electromechanical coupling of human cardiac muscle in a 3D bioprinted, chambered organoid. *Circ Res.* 2020; 127: 207-224.
57. Matsunari H, Watanabe M, Hasegawa K et al. Compensation of disabled organogenesis in genetically modified pig fetuses by blastocyst complementation. *Stem Cell Rep.* 2020; 14(1): 21-33.
58. Yamaguchi T, Sato H, Kato-Itoh M et al. Interspecies organogenesis generates autologous functional islets. *Nature.* 2017; 542(7640): 191-196.
59. Crane AT, Aravalli RN, Asakura A et al. Interspecies organogenesis for human transplantation. *Cell Transpl.* 2019; 28 (9-10): 1091-1105.
60. Garry DJ, Garry MG. Interspecies chimeras and the generation of humanized organs. *Circ Res.* 2019; 124(1): 23-25.
61. Konstantinov IE, Ye XT, Fricke TA. From cellular senescence to regeneration: a quest for the holy grail for the next generation of surgeons? *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2017; 154(3): 953-954.
62. Founta KM, Papanayotou C. In vivo generation of organs by blastocyst complementation advances and challenges. *Int J Stem Cells.* 2022; 15(2): 113-121.

Si desea citar nuestro artículo:

García-Montero Blanco C. Avances en Xenotrasplante, Bioimpresión Aditiva 3D y Manipulación Génica para el futuro del Trasplante Cardíaco. *An RANM.* 2023;140(02): 170-184. DOI: 10.32440/ar.2023.140.02. rev06
