

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 264 862**

21 Número de solicitud: 200402083

51 Int. Cl.:
A61L 17/00 (2006.01)
C12N 5/08 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **25.08.2004**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **16.01.2007**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.01.2007

71 Solicitante/s: **CELLERIX, S.L.**
Marconi, 1
Parque Tecnológico de Madrid (PTM)
28760 Tres Cantos, Madrid, ES
Universidad Autónoma de Madrid

72 Inventor/es: **García Olmo, Damián;**
Fernández Miguel, María Gema;
González de la Peña, Manuel Angel y
Bernad Miana, Antonio

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

54 Título: **Biomaterial para sutura.**

57 Resumen:

Biomaterial para sutura.

La presente invención se refiere a un biomaterial para sutura que comprende un material de sutura fisiológicamente compatible, denominado material de soporte, recubierto de una población celular con capacidad proliferativa y/o de diferenciación, características necesarias de cara a su participación en la regeneración del tejido en el que se realice la sutura. Así, este biomaterial para sutura no se limita a aproximar los dos extremos de la herida abierta, sino que a su vez contribuye activamente en su cicatrización acelerando el proceso de reparación tisular.

ES 2 264 862 A1

DESCRIPCIÓN

Biomaterial para sutura.

5 La presente invención se refiere a un material para sutura y sus aplicaciones. En concreto, la invención se refiere a un material para sutura recubierto de células que contribuye de forma biológicamente activa en el proceso de reparación tisular y por ello en la cicatrización de las heridas.

Antecedentes de la invención

10 Toda herida abierta representa un riesgo de infección, así como una vía de escape de aire y fluidos orgánicos, por lo que su cierre se convierte en una urgente necesidad. En heridas superficiales de la piel, que no traspasan la dermis, se produce un cierre primario espontáneo por la toma de contacto de los bordes de la herida, mientras que en aquellas heridas dónde existe una clara separación de los tejidos, solamente la acción quirúrgica (sutura de la herida) puede
15 conseguir este cierre primario, también denominado cura por primera intención.

Tradicionalmente, la sutura ha sido el método clásico para el afrontamiento de los bordes de la herida con vista a lograr la rápida cicatrización de los tejidos. La cura por primera intención mediante sutura, consiste en la aproximación de los bordes de la herida gracias a la introducción de un hilo de sutura en el tejido mediante una aguja metálica unida
20 a uno de sus extremos y la realización de pases sucesivos entre ambos lados de la incisión facilitando de una forma pasiva el cierre de la herida.

Además, las suturas son utilizadas en la práctica quirúrgica para detener el sangrado (hemostasis), así como en la reparación de órganos y otras estructuras del cuerpo humano. En algunas situaciones estas suturas son especialmente
25 delicadas por las dificultades de cicatrización de los tejidos en los que se asientan. Tal es el caso de las suturas de la pared del colon, los tendones así como en microcirugía en tejido nervioso y vasos sanguíneos.

Uno de los mayores inconvenientes que presenta la sutura de tejidos, es el hecho de que el diámetro de la aguja es mayor al del hilo, de manera que el punto de inserción de la aguja no será totalmente ocupado por éste, generándose zonas por las que puede haber pérdida de fluidos. Este cierre deficiente de la herida es frecuentemente
30 causa de complicaciones post-quirúrgicas, como por ejemplo, en el caso de anastomosis intestinales realizadas en pacientes afectos de carcinoma o diverticulosis, a los que se ha debido practicar una resección del segmento intestinal enfermo, para posteriormente unir los dos extremos sanos. En dichos pacientes, debido a un cierre incompleto, se pueden producir pérdidas de materia fecal con invasión de los tejidos circundantes, lo cuál será causa de peritonitis, con el consiguiente riesgo para la vida del paciente. Este riesgo se ve aumentado en pacientes que
35 presentan una reducción del espesor de la pared intestinal, como en el caso de la enfermedad inflamatoria intestinal. En un intento de evitar las fugas de forma pasiva, se utilizan adhesivos biomédicos que serán aplicados sobre los puntos de sutura, de manera que quede sellada la apertura generada por el paso del hilo a través del tejido.

40 El uso de grapas representa una alternativa al método clásico de sutura. Permite realizar el cierre primario de los tejidos en un menor tiempo, reducir la pérdida de sangre, disminuir la contaminación y preservar el flujo sanguíneo. Un factor limitante en el empleo de grapas como método de cura por primera intención, es la necesidad de tener acceso a la parte superior e inferior del tejido a unir. Asimismo, debido a la fuerza ejercida al ingerir las grapas pueden
45 producirse desgarros en el tejido. Una solución a este problema, en un nuevo intento de contención pasiva, es decir, sin contribuir de forma biológicamente activa a la mejora del programa de la cicatrización y reparación de tejidos, es la aplicación de un bioadhesivo sobre la zona de inserción de la grapa.

Dichos adhesivos biocompatibles, actúan facilitando la aposición de los tejidos proporcionando así una fuerza de
50 tensión biomecánica estable y regular, a lo largo de todo el trayecto incisional, ayudando con esto al mantenimiento de la estructura tisular en el lugar de la lesión. Pueden dividirse en dos categorías: adhesivos biológicos, sintetizados a partir de proteínas plasmáticas y polímeros sintéticos, principalmente cianoacrilato y sus derivados.

55 El mayor inconveniente que presentan los adhesivos de origen biológico es el riesgo de transmisión viral. Asimismo, los bioadhesivos sintéticos actualmente disponibles tienen varios inconvenientes. En su mayoría son líquidos, siendo de difícil aplicación, de manera que su uso queda restringido a heridas superficiales. Por otra parte, son sustancias con carácter alergénico y potencialmente tóxico. Ha sido descrito que dichos materiales inducen una respuesta inflamatoria en el organismo, lo cual contribuye a retrasar la regeneración y cicatrización de los tejidos, limitando mucho su utilidad (Aronson *et al.*, 1970; Milde *et al.*, 1989). Por tanto, un método que permita el cierre de heridas y
60 la sutura de tejidos sin inducir una respuesta inflamatoria, sin necesidad de que sean utilizados este tipo de adhesivos, representaría un avance especialmente importante en el caso de sutura de tejidos internos.

Por otra parte, la evolución de las suturas ha llegado a tal punto de refinamiento, que existen suturas específicamente
65 diseñadas para cada tipo de intervención. El cirujano elige la sutura en función de la naturaleza del procedimiento, las características del paciente, la tensión que debe soportar la sutura,... Hay disponibles en el mercado una gran variedad de hilos de sutura: absorbibles y no absorbibles, de estructura monofilamento y multifilamento, así como de origen natural y sintético.

Con el objetivo de mejorar las características funcionales de los hilos de sutura, existen diversas patentes (GB577047, GB1401842, GB1430554, RU2125469) en que los hilos son impregnados de sustancias germicidas para evitar la contaminación de los puntos de sutura.

5 La patente europea EP0652017 protege biomateriales, en cuya definición estarían comprendidos los materiales de sutura, que han sido recubiertos para evitar la deposición sobre el hilo de constituyentes sanguíneos, y retrasar así la coagulación. En dicha patente se encuentra también descrito el uso de anticoagulantes y sustancias con propiedades antiinflamatorias como material de recubrimiento del biomaterial.

10 La patente US6264675 protege un material de sutura que comprende un hilo de sutura recubierto de un material adhesivo cuyas propiedades de adhesión se activan al ser insertado en el tejido a reparar, el cual se encuentra unido a una aguja por uno de sus extremos. El bioadhesivo utilizado en dicha invención solventa uno de los principales problemas asociados al método de sutura, ya que evita las pérdidas de fluidos a través de los puntos de inserción de la aguja. No obstante, presenta como inconvenientes el carácter alergénico y potencial toxicidad inherente a la propia
15 naturaleza de los bioadhesivos.

Por otra parte hay que tener en cuenta que todos los materiales de sutura inducen “*per se*” una respuesta inmunológica del organismo por reconocimiento de cuerpo extraño, lo que sistemáticamente entorpecen la cicatrización natural de los tejidos. Por ello conseguir ocultar el material extraño al sistema inmunológico, mediante un recubrimiento
20 celular autólogo, sería de nuevo un avance especialmente importante en los casos de suturas comprometidas.

Los métodos de sutura citados contribuyen a la aposición de los tejidos de manera pasiva, sin participar de forma biológicamente activa en la cicatrización del tejido.

25 Por otra parte, se conocen diversas poblaciones celulares presentes en el adulto, capaces de contribuir a la reparación de tejidos conectivos. Así, por ejemplo, el estroma de la médula ósea contiene, entre otras, una población de células denominadas células madre mesenquimales (Friedenstein *et al.*, 1976; Caplan *et al.*, 1991; Pittenger *et al.*, 1999). Estudios realizados en estas células, han demostrado que pueden diferenciarse a distintos linajes celulares mesenquimales, como adipocitos (Beresford *et al.*, 1992), condrocitos (Johnstone *et al.*, 1998), mioblastos (Wakitani *et al.*, 1995) y osteoblastos (Haynesworth *et al.*, 1992). Asimismo, en el tejido adiposo, que al igual que la médula ósea deriva del mesoderma embrionario y está constituido por una población celular heterogénea, se han identificado células madre multipotenciales, que pueden ser fácilmente aisladas (Zuk *et al.*, 2001). Estas células son similares, aunque no idénticas, a las células madre mesenquimales de la médula ósea (De Ugarte *et al.*, 2003) y son también capaces de diferenciarse a múltiples linajes celulares mesenquimales (condrocitos, osteocitos, adipocitos y mioblastos). Además,
30 al igual que las células madre mesenquimales procedentes de médula ósea, presentan capacidad de diferenciación a neuronas (Zuk *et al.*, 2002).

La capacidad de establecer uniones entre tejidos biológicos ha sido uno de los principales retos en la investigación biomédica. La sutura ideal es aquella que presenta características de resistencia y fácil manejo, no induce una respuesta
40 inflamatoria del tejido y no promueve la infección. Es decir, aquella cuyo uso no sólo permite el cierre de la herida sino que contribuye a su completa curación.

La presente invención hace referencia a un material para sutura que permite acercar los extremos tisulares, facilitando la cura por primera intención, y a su vez acelerar el proceso de reparación, contribuyendo de manera biológicamente activa a la cicatrización del tejido. El uso de dicho material comporta también una menor inflamación del tejido en el que se realiza la sutura, lo cual permite disminuir el tiempo requerido para la curación de la herida abierta, minimizando el riesgo de infección y de pérdidas de fluidos orgánicos y con ello, el número de fracasos quirúrgicos.

50 Explicación de la invención

El biomaterial para sutura de la presente invención comprende un material de sutura fisiológicamente compatible, denominado material de soporte, recubierto de una población celular con capacidad proliferativa y/o de diferenciación, características necesarias de cara a su participación en la regeneración del tejido en el que se realice la sutura. Así, este biomaterial para sutura no se limita a aproximar los dos extremos de la herida abierta, sino que a su vez contribuye activamente en su cicatrización acelerando el proceso de reparación tisular. Dicha innovación representa una importante ventaja, en especial en el caso de sutura en órganos internos, y en particular en el caso de anastomosis intestinales, resultado de resecciones del tracto gastrointestinal o en la zona urogenital.

60 Un primer aspecto de la invención proporciona un biomaterial para sutura, útil como agente terapéutico en el tratamiento de heridas, tanto accidentales como quirúrgicas y en la sutura de tejidos. Este biomaterial comprende un material de soporte para sutura y una población celular, caracterizada por presentar capacidad proliferativa y/o de diferenciación, recubriendo dicho material de soporte.

65 En un aspecto preferido, el material de soporte para sutura utilizado incluye pero no se limita a grapas, hilos absorbibles, hilos no absorbibles, hilos de origen natural, hilos de origen sintético, hilos de estructura monofilamento e hilos de estructura multifilamento (también denominados trenzados).

ES 2 264 862 A1

En otro aspecto preferido, el material de soporte para sutura utilizado incluye pero no se limita a hilos absorbibles, hilos no absorbibles, hilos de origen natural, hilos de origen sintético, hilos de estructura monofilamento e hilos de estructura multifilamento o trenzados, unidos a una aguja metálica para sutura.

5 En un aspecto más preferido, el material de soporte para sutura utilizado son hilos absorbibles, de origen sintético, de estructura monofilamento, unidos a una aguja metálica para sutura.

Un segundo aspecto de la invención comprende el utilizar células con capacidad proliferativa y/o de diferenciación, como población celular de recubrimiento del biomaterial para sutura.

10 Un aspecto preferido comprende el utilizar células madre como población celular de recubrimiento del biomaterial para sutura.

15 Un aspecto más preferido comprende el utilizar células madre pluripotentes, capaces de diferenciar a cualquier tipo de tejido, como población celular de recubrimiento del biomaterial para sutura.

Un aspecto aún más preferido comprende el utilizar células madre multipotentes, capaces de diferenciar a diversos tipos de tejido, como población celular de recubrimiento del biomaterial para sutura.

20 Un aspecto especialmente preferido comprende el utilizar células madre adultas multipotentes, como población celular de recubrimiento del biomaterial para sutura.

25 En una realización particular, la invención proporciona un biomaterial para sutura que comprende un hilo de sutura unido a una aguja metálica por uno de sus extremos como material de soporte y como población celular de recubrimiento células madre adultas multipotentes de origen mesodérmico.

30 En una realización preferida de la invención, las células madre adultas multipotentes, capaces de diferenciarse a diferentes tipos celulares, utilizadas como población de recubrimiento son aisladas a partir de tejido adiposo humano. En humanos la fuente preferida de tejido adiposo es el tejido graso subdérmico, siendo el método preferido de recolección el lipoaspirado.

Otro aspecto de la invención comprende el utilizar como población celular de recubrimiento células de origen autólogo o alogénico o xenogénico, o bien combinaciones de éstas. Preferentemente, la población celular de recubrimiento serán células de origen autólogo.

35 Un aspecto especialmente preferido comprende el utilizar células madre adultas multipotentes autólogas aisladas de lipoaspirado, como población celular de recubrimiento del biomaterial para sutura de la invención (Ejemplo 1). El uso de células madre adultas autólogas presenta como ventaja que por su naturaleza son inmunocompatibles, y por tanto, no generan problemas de inflamación, ni rechazo. Además su uso no presenta impedimentos de tipo ético y legal. En una realización preferida de la invención, dicho biomaterial para sutura comprende como población celular de recubrimiento células madre adultas autólogas siendo su uso restringido al paciente del cual proceden dichas células.

40 Un tercer aspecto de la invención comprende el utilizar células madre, que expresen al menos una característica propia de una célula especializada, como población celular de recubrimiento del biomaterial para sutura de la invención.

45 Una realización preferida de la invención comprende el utilizar células progenitoras de un linaje celular especializado y obtenidas a partir de células madre del paciente, que expresen al menos una característica propia de célula progenitora especializada, como población celular de recubrimiento del biomaterial para sutura de la invención. Por tanto, no se generarán problemas de inflamación, ni rechazo, más aún los componentes de los materiales de sutura quedarían ocultos al sistema inmunológico por el recubrimiento con células madre autólogas, lo que sin duda mejoraría el proceso reparativo.

50 Un aspecto preferido comprende el utilizar células madre que han sido inducidas a diferenciarse *in vitro* a células que expresen al menos una característica propia de una célula especializada, como población celular de recubrimiento del biomaterial para sutura.

55 Un aspecto más preferido comprende el utilizar células madre multipotentes, que han sido inducidas a diferenciarse *in vitro* a células que expresen al menos una característica propia de una célula especializada, como población celular de recubrimiento del biomaterial para sutura. Que incluye pero no se limita a los siguientes tipos celulares: célula epitelial, célula endotelial, adipocito, miocito, condrocito, osteocito, neurona, astrocito, oligodendrocito, hepatocito y célula pancreática.

60 Un cuarto aspecto de la invención comprende el biomaterial para sutura de la invención, en el que la población celular de recubrimiento ha sido genéticamente modificada.

65 Un aspecto preferido comprende el biomaterial para sutura, en el que la población celular de recubrimiento ha sido genéticamente modificada de manera que exprese factores que contribuyan al proceso de reparación tisular, que incluyen pero no se limitan a: factores de crecimiento, factores morfogenéticos, proteínas estructurales y citoquinas.

Un quinto aspecto de la invención comprende el biomaterial para sutura de la invención, en el que la población celular de recubrimiento está constituida por una población celular heterogénea. Se define población celular heterogénea como aquella que comprende células de distintos tipos celulares o células en diferentes estadios de diferenciación o bien combinaciones de ambas.

5

Un sexto aspecto de la invención proporciona un método para la obtención del biomaterial para sutura de la invención, en el que la población celular de recubrimiento se une al material de soporte mediante adhesión.

Un aspecto preferido de la invención proporciona un método para la obtención del biomaterial para sutura en el que la población celular de recubrimiento se une al material de soporte mediante adhesión. Dicho método comprende:

10

1. expandir la población celular de elección;
2. sumergir el material de sutura en un medio de cultivo adecuado para dicha población celular;
3. inocular una suspensión de la población celular pre-cultivada sobre el material de sutura;
4. cultivar la preparación anterior en condiciones adecuadas, que incluye pero no se limita a cultivo en placas y cultivo dinámico en tubos;
5. aislar el material de soporte que presenta un recubrimiento celular adecuado.

15

20

Las etapas de expansión y cultivo de la población celular utilizada en el recubrimiento del material de soporte del biomaterial, serán evidentes para cualquier experto en la materia.

25

Un aspecto más preferido de la invención proporciona un método para la obtención del biomaterial para sutura, en el que el material de soporte ha sido previamente recubierto de un material cuya función es aumentar la adhesión de la población celular de recubrimiento. Dicho material de recubrimiento del material de soporte incluye pero no se limita a péptidos, antígenos proteicos, anticuerpos, azúcares y lípidos. En un aspecto aún más preferido, dicho material de recubrimiento son proteínas de matriz extracelular de células eucariotas o anticuerpos.

30

Otro aspecto preferido proporciona un método para la obtención del biomaterial para sutura, que comprende la modificación genética de la población celular de elección, previamente a la expansión de dicha población celular.

35

Un octavo aspecto comprende el uso del biomaterial para sutura de la invención en terapia.

Un aspecto preferido comprende el uso del biomaterial para sutura en la aproximación de los bordes tisulares, que incluye pero no se limita a su aplicación terapéutica en hemostasis, transplante de órganos, cirugía del tracto gastrointestinal, cirugía del tracto urogenital, cirugía del tracto respiratorio, cirugía ocular, cirugía vascular, cirugía plástica y reparadora, cirugía en tejido muscular, en tejido epitelial, en tejido nervioso, así como en reparación de tendones, tejido óseo y tejido cartilaginoso.

40

Un aspecto más preferido de la invención comprende el uso de las suturas recubiertas de células madre autólogas en los casos en que la reacción inflamatoria local generada por el material de sutura pueda perjudicar los resultados de la intervención quirúrgica.

45

Un aspecto todavía más preferido comprende el uso del biomaterial para sutura en la aproximación de los bordes tisulares en toda actividad quirúrgica donde sea deseable una mejora de la capacidad de cicatrización local.

50

Un aspecto aún más preferido comprende el uso del biomaterial para sutura en la aproximación de los bordes tisulares en anastomosis intestinales.

Otro aspecto preferido comprende el uso del biomaterial para sutura en la sujeción de prótesis, como por ejemplo válvulas cardíacas o válvulas neuroquirúrgicas.

55

Otro aspecto de la invención, comprende el uso de cualquier material protésico (o artefacto) usado en medicina que se implante en el cuerpo humano con los que frecuentemente haya problemas de biocompatibilidad, como por ejemplo válvulas implantadas y prótesis quirúrgicas, que haya sido recubierto de células.

60

Descripción de las figuras

Las figuras 1a-1e muestran una fotomicrografía de contraste de fases, en modo visible, de los distintos fragmentos de hilos de sutura usados como material de soporte en el ejemplo 1. Donde la figura 1a muestra el tipo de hilo absorbible vicryl (Ethicon) ref. V460; la figura 1b muestra el tipo de hilo absorbible monocryl (Ethicon) ref. Y3110; la figura 1c muestra el tipo de hilo absorbible Dexon II (USS-DG) Ref. 9819-0 41; la figura 1d muestra el tipo de hilo absorbible Safil quick (B/Braun) Ref. 0046030 y la figura 1e muestra el tipo de hilo no absorbible Ethilon (Ethicon) Ref. W1621.

65

ES 2 264 862 A1

Las figuras 2a-2e ilustran mediante una fotomicrografía de contraste de fases, en modo ultravioleta, el grado de recubrimiento celular alcanzado en los fragmentos de hilos de sutura usados en el ejemplo 1, tras una semana de incubación. Donde la figura 2a muestra el tipo de hilo absorbible vcrlyl (Ethicon) ref. V460; la figura 2b muestra el tipo de hilo absorbible monocryl (Ethicon) ref. Y3110; la figura 2c muestra el tipo de hilo absorbible Dexon II (USS-DG) Ref. 9819-41; la figura 2d muestra el tipo de hilo absorbible Safil quick (B/Braun) Ref. 0046030 y la figura 2e muestra el tipo de hilo no absorbible Ethilon (Ethicon) Ref. W1621.

Las figuras 3a-3b ilustran el aspecto general que presentaba la cavidad abdominal de las ratas tras ser laparotomizadas en el cuarto día post-operatorio. Una comparación del aspecto general (inflamación, adherencias generales,..) nos permiten ya diferenciar dos patrones en la evolución de la cicatrización de la sutura anastomótica.

La figura 3a muestra una fotografía de una de las ratas (n° 1) pertenecientes al grupo A (cirugía realizada con el biomaterial para sutura de la invención). La figura 3b muestra una fotografía de una de las ratas (n° 3) pertenecientes al grupo B (cirugía realizada con hilos Vicryl® 4/0).

Las figuras 4a-4b corresponden a una fotografía del segmento cólico que contenía la anastomosis una vez introducido un catéter por el extremo proximal, antes de proceder a la determinación de la presión de ruptura. La figura 4a muestra una fotografía del segmento cólico de una de las ratas (n° 1) pertenecientes al grupo A (cirugía realizada con el biomaterial para sutura de la invención). La figura 4b muestra una fotografía del segmento cólico de una de las ratas (n° 3) pertenecientes al grupo B (cirugía realizada con hilos Vicryl® 4/0). Con el objeto de comparar el grado de inflamación que presenta el segmento cólico resecaado en las figuras 4a y 4b, se ha tomado como referencia la longitud de una porción del catéter, que se ha dibujado como una línea negra en la parte inferior de las figuras y cuyo tamaño real son 7 mm.

La figura 5 muestra un diagrama que ilustra la variación de la resistencia física de una sutura cólica ante los incrementos de presión intraluminal, en función del tiempo transcurrido desde su realización. Así, se ha observado que tras las primeras horas de postoperatorio se produce un descenso en la resistencia, detectándose los valores más bajos entre el tercer y cuarto día del postoperatorio.

30 Descripción detallada de modos de realización

La invención proporciona un biomaterial para sutura que comprende un material de soporte para sutura, preferentemente un hilo de sutura, y una población celular recubriendo dicho material de soporte. Esta población celular de recubrimiento se caracteriza porque presenta capacidad proliferativa y/o de diferenciación.

En una realización particular, la invención proporciona un biomaterial de sutura que comprende un hilo de sutura unido a una aguja metálica por uno de sus extremos como material de soporte y como población celular de recubrimiento células madre adultas autólogas derivadas de lipoaspirado.

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar, pero no limitan la presente invención.

Ejemplo 1

Recubrimiento de hilos de sutura con células madre adultas humanas derivadas de tejido adiposo

El objetivo del presente experimento ha sido el estudiar la capacidad de adhesión de un determinado tipo celular a diferentes tipos de hilos de sutura, que actúan como material de soporte del biomaterial para sutura de la presente invención.

50 1.1. Materiales

Se utilizaron 5 tipos diferentes de hilo de sutura, de igual grosor 3-0 (2 Ph. Eur.). Todos ellos de origen sintético (Tabla I).

55 Como población celular de recubrimiento se utilizaron células madre adultas derivadas de lipoaspirados (CMDLs) humanas, adherentes, que habían sido previamente transducidas con vectores retrovirales que codifican Cop-GFP, proteína fluorescente verde, utilizados como gen marcador.

60 1.1.1. Aislamiento de CMDLs

El tejido adiposo fue obtenido mediante liposucción. Se introdujo una cánula de extremo romo en el espacio subcutáneo gracias a una pequeña incisión periumbilical (menos de 0.5 cm de diámetro). Se realizó la succión, deslizando la cánula a través del compartimiento de tejido adiposo situado bajo la pared abdominal, ayudando así, a la disrupción mecánica del tejido adiposo. Con el objetivo de minimizar la pérdida de sangre, se inyectó solución salina y epinefrina, como agente vasoconstrictor. Mediante este método se obtuvieron, 80-100 ml de lipoaspirado crudo de cada paciente.

Se procedió al lavado del lipoaspirado con solución salina tamponada con fosfato (PBS). A continuación, se realizó la disrupción del tejido adiposo mediante digestión de la matriz extracelular con colagenasa tipo II en solución salina (5

ES 2 264 862 A1

mg/ml) a 37° durante 30 minutos para liberar la fracción celular. Se inactivó la colagenasa por adición de un volumen equivalente de medio DMEM, con un 10% de suero bovino fetal. Dicha suspensión celular se centrifugó a 250 g durante 10 minutos obteniéndose un depósito de células. Dichas células se resuspendieron en medio DMEM, con un 10% de suero bovino fetal. Se añadió NH₄Cl a una concentración final de 0.16M y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente para inducir la lisis de los eritrocitos presentes. La suspensión fue centrifugada a 250-400 g y se resuspendió en DMEM-10% FBS con 1% ampicilina-estreptomicina. Finalmente, se plaquearon las células, inoculándose 20-30.000 células por cm².

1.1.2. Cultivo de CMDLs

Las células se mantuvieron en cultivo durante 20-24 horas a 37°C, en atmósfera con 5% de CO₂. Tras 24 horas de incubación, las placas se lavaron con PBS para eliminar aquellas células que no presentaban adherencia, así como restos celulares.

1.1.3. Transfección de CMDLs adherentes con el gen marcador Cop-GFP

Transfección de las CMDLs que presentaban características de adherencia mediante transducción con sobrenadantes que contenían partículas retrovirales, RetroFect®, pseudotipadas con VSV-G (glicoproteína de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular), que codifican el gen marcador Cop-GFP. Cop-GFP es una proteína verde fluorescente de copépodo (*Pontellina plumata*) y permite la fácil identificación y selección de las células infectadas por fluorescencia directa. Dicha proteína fluorescente no entra en el núcleo celular. Esto constituye una ventaja, ya que las células que están expresando la proteína Cop-GFP pueden ser fácilmente distinguidas de partículas fluorescentes interferentes.

El método utilizado en la transducción de las CMDLs adherentes consistió en:

1. Se añadió polibreno (adyuvante para la transducción retroviral) al sobrenadante retroviral a una concentración final de polibreno de 8 µg/ml.
2. Se cambió el medio de las células diana y se reemplazó por las partículas retrovirales, usando aproximadamente 106 µl de sobrenadante retroviral (aditivos incluidos) por cada cm² de superficie.
3. Para infectar las células se utilizó un método de transducción dinámico. Se centrifugaron las células a 1000 g durante 60 minutos a 37°C en presencia del sobrenadante retroviral.
4. Se retiró el sobrenadante y se añadió medio de cultivo fresco DMEM completo (DMEM-10% FBS con 1% ampicilina-estreptomicina). Las células transducidas se cultivaron durante 48-72 h en dicho medio de cultivo.
5. Las células se despegaron de las placas de cultivo con una mezcla de tripsina-EDTA.
6. Se analizó una alícuota mediante citometría de flujo, el resto de células se pasaron a otro recipiente de cultivo para expandirlas.

1.2. Ensayo de adhesión de las células a los hilos de sutura

Como material de soporte, se ensayaron los 5 distintos tipos de hilos de sutura seleccionados. Se cortaron fragmentos de aproximadamente 1 cm de longitud, introduciéndose 2 fragmentos de hilo por pocillo, en placas de cultivo de 24 pocillos.

1. Se añadieron 0,5 ml de medio de cultivo DMEM completo, en cada uno de los pocillos, para humedecer los hilos y averiguar si los hilos iban a permanecer sumergidos en el medio de cultivo o flotarían. Los hilos ensayados no flotarían o tras forzar su inmersión permanecieron en el fondo de los pocillos.
2. Se preparó una suspensión de células CMDL a una concentración de 50.000 cels/ml y se añadió 1 ml de esta suspensión en cada pocillo.
3. Las placas de cultivo en que se habían depositado los hilos, fueron cultivadas en presencia de la suspensión celular en atmósfera con 5% CO₂ a 37°C, durante 20-24 horas.
4. Se observó al microscopio el grado de recubrimiento celular de los hilos alcanzado tras 20-24 horas de incubación, en modo visible y en modo de fluorescencia.

En modo visible no es posible detectar las células sobre los hilos pero si permitió detectar la presencia de células muy dispersas en el fondo del pocillo. Mientras que en modo fluorescencia, gracias a la expresión de la proteína Cop-GFP en las células CMDL transfectadas, se observaron algunas células fluorescentes individuales sobre los hilos, aunque en número muy escaso.

ES 2 264 862 A1

5. Se observó al microscopio el grado de recubrimiento celular de los hilos alcanzado 48 horas de incubación, en modo visible y en modo de fluorescencia. No se observaron cambios significativos en la cobertura de los hilos, respecto a las 24 horas de incubación. Se trasladaron los hilos a pocillos con nuevo medio de cultivo.

5 A partir de este momento, el medio de cultivo fue cambiado cada 2-3 días según calendario.

6. Se observó al microscopio el grado de recubrimiento celular de los hilos alcanzado a las 72 horas de incubación, en modo visible y en modo de fluorescencia. Se pudieron observar y fotografiar grupos de células sobre algunos de los hilos ensayados, incluso se pudo diferenciar las células individuales al distinguirse el núcleo de las mismas ya que la proteína Cop-GFP no se expresa en el núcleo de la célula.

7. Tras 1 semana de incubación de las células CMDL transducidas con la proteína Cop-GFP en presencia de los hilos, se observó un aumento en el grado de recubrimiento celular de la superficie de los hilos gracias a las células generadas por división a partir de aquellas que inicialmente se adhirieron a los hilos.

Ejemplo 2

Uso del biomaterial de sutura en anastomosis intestinales

El objetivo de este ensayo ha sido el determinar las características del biomaterial para sutura que proporciona la presente invención y las ventajas que aporta su uso frente a hilos de sutura convencionales, mediante la realización de anastomosis cólicas en ratas.

Tras realizar la anastomosis con el biomaterial para sutura de la invención y paralelamente con hilos no recubiertos de células, utilizados como control negativo, se determinaron una serie de parámetros que permitieron valorar el estado de la lesión anastomótica y comparar los resultados obtenidos con ambos tipos de hilos.

2.1. Intervención quirúrgica

2.1.1. Animales y material de sutura

En la realización de la experiencia se utilizaron 12 ejemplares adultos de ratas BDIX, con un peso comprendido entre 130-260 gramos. Dos para la obtención de células madre de rata del tejido adiposo subdérmico y 10 para el estudio de suturas cólicas. Los hilos recubiertos de células se hicieron siguiendo un protocolo similar al ilustrado en el ejemplo I. Las ratas BDIX son singénicas, es decir, son genéticamente idénticas e inmunológicamente compatibles. Cada rata se identificó con un número del 1-10 y a cada una le correspondía un lote de suturas con el mismo número.

La muestra se dividió en dos grupos, en función del material de sutura utilizado en la anastomosis:

- Grupo A (5 ratas): Anastomosis cólica simple realizada con el biomaterial de sutura de la invención. Concretamente, se utilizaron hilos Vicryl® (Polyglactin 910) 4/0, sutura trenzada absorbible, que habían sido tapizados con células derivadas de tejido adiposo de ratas BDIX. En la preparación del biomaterial de sutura de la invención fue utilizado el mismo protocolo que en el Ejemplo 1.
- Grupo B (5 ratas): Se considera como grupo control. Anastomosis cólica simple realizada con hilos Vicryl® (Polyglactin 910) 4/0.

El 50% de los lotes de sutura se cultivaron en presencia de células madre (biomaterial para sutura de la invención) y la otra mitad fueron incubadas, en idénticas condiciones, tan sólo en presencia de medio de cultivo. Por tanto, resultaba imposible diferenciar los 2 tipos de suturas empleados por su aspecto. Se trata de un estudio ciego puesto que los cirujanos desconocían el tipo de hilo empleado en cada intervención.

2.1.2. Anastomosis cólica simple

Las ratas fueron laparotomizadas bajo anestesia general tras 24 horas de ayuno con agua “*ad libitum*”. Se practicó una sección completa del colon en el punto medio del colon transversal, cuidando de no lesionar la vascularización marginal y evitando la hemorragia. A continuación, se realizó una anastomosis de los cabos, termino-terminal, evertida y en un plano, con al menos 6 puntos de sutura. Cada punto se anudó tres veces. Finalizada la anastomosis se reintrodujo el colon en la cavidad abdominal y se cerró la laparotomía con hilo de seda del 0 en dos planos.

2.2. Valoración de la cicatrización

Los animales fueron sacrificados, por decapitación, el cuarto día postoperatorio. Con el animal en asistolia se procedió a la apertura del abdomen y se valoraron la dehiscencia, dilatación, obstrucción, adherencias generales, dificultad en la separación de las adherencias generales y determinación de estructuras adheridas.

ES 2 264 862 A1

Criterios de valoración de las variables a estudio:

1. Dehiscencia clínica (De): Existencia de contenido cólico libre en la cavidad peritoneal.
- 5 2. Dilatación (Di): Se considera positiva cuando el diámetro del colon transversal pre-anastomótico era al menos dos veces superior al diámetro del colon transversal post-anastomótico.
3. Obstrucción (Ob): Ausencia de contenido fecal en el colon distal a la anastomosis.
- 10 4. Adherencias generales (AG): Se realiza una medida basada en una escala de valoración cualitativa del número de adherencias de la cavidad peritoneal (Ellis H., 1962; Verreet PR *et al.*, 1992). Se establecieron 4 niveles o grados: 0 = No hay adherencias, 1 = Adherencias muy localizadas, 2 = Adherencias loco-regionales, 3 = Adherencias difusas.
- 15 5. Separación de las adherencias generales (Se). Lisis por tracción: Se establecieron 3 niveles: 1 = Fácil, la mayoría de las adherencias podían separarse con una tracción suave, 2 = Moderado, la mayoría de las adherencias se podían separar mediante un instrumento romo, 3 = Difícil, la mayoría de las adherencias precisaron un instrumento punzante para ser separadas.
- 20 6. Estructuras adheridas (EA): Se valora qué estructuras anatómicas se habían adherido a la circunferencia anastomótica. Se establecieron 4 categorías: 1 = epipión, 2 = intestino delgado, 3 = colon, 4 = otras localizaciones

25 La medición de la resistencia a la presión intraluminal se puede expresar como presión de ruptura, es decir, la presión a la que se produce la disrupción de una anastomosis sometida a presión intraluminal creciente, o bien como tensión de ruptura, que expresa la tensión circular a la que está sometida la pared en el momento de la ruptura.

2.2.1. Medida de la presión de ruptura (PR)

30 Mediante una bomba de infusión conectada a un sistema de medición de presiones se determina la presión a la que se produce el escape por la línea anastomótica (presión de ruptura).

35 Una vez resecado el segmento cólico que contenía la anastomosis, se procedió al cierre del extremo distal con sutura de seda 1/0. El extremo proximal fue ligado de forma similar una vez introducido un catéter de perfusión intravenosa. El catéter es conectado a una llave de tres pasos o sistema en "T", en la que una de las ramas se dirige a la cápsula de un transductor de presión que registra las variaciones de presión y envía estas señales a un sistema de poligrafía digital. Estos datos son finalmente enviados a un ordenador para proceder a su análisis y almacenamiento.

40 La otra rama se conecta a una bomba de perfusión cargada con suero fisiológico coloreado con azul de metileno para observar el momento y el punto de ruptura.

2.2.2. Tensión de ruptura de la pared (TR)

45 El cálculo de la tensión de ruptura está determinado por la medición de la circunferencia anastomótica tras la fijación de la pieza en formol al 20% durante cuatro días. Se practicó un corte longitudinal con bisturí del segmento de colon que contenía la anastomosis y mediante una regla graduada, se midió la circunferencia interna (cn) de la pieza en décimas de milímetro. El conocer la longitud de la circunferencia interna nos permite calcular el radio interno del colon (r), aplicando la siguiente fórmula: $cn=2\pi r$.

50 La tensión de ruptura (TR) es función de la presión de ruptura (PR) y del radio interno del colon (r) en virtud de la Ley de Laplace. Se obtiene aplicando la siguiente fórmula:

$$TR = 1,33 \times 10^3 \times PR \times r \quad (TR = \text{dinas/cm; PR} = \text{mmHg; } r = \text{cm})$$

55 2.3. Resultados

60 Se realizó una anastomosis cólica en 10 ratas adultas BDIX que se distribuyeron en dos grupos A y B, en función del material de sutura utilizado. Dos de los animales intervenidos con el objeto de valorar la cicatrización de la anastomosis, uno correspondiente a cada uno de los grupos, tuvieron que ser excluidos del estudio. En uno de los animales, durante la cirugía se produjo un desgarro de mesosigma, mientras que en el otro se produjo un desgarro de la anastomosis al introducir el catéter en el extremo cólico-distal en el momento de medir la presión de ruptura.

65 En la tabla 2 se presentan los resultados obtenidos para las diferentes variables analizadas en la valoración de la sutura anastomótica.

2.4. Discusión

La valoración de la cicatrización de la herida anastomótica se realizó el cuarto día postoperatorio, por considerarlo el día crítico en la evolución de las anastomosis cólicas (Rayo, 1988).

Tras la apertura de la cavidad abdominal, los cuadrantes fueron retraídos exponiendo de forma global toda la cavidad peritoneal. Sorprendentemente, una valoración del aspecto general (inflamación, adherencias generales,..) es suficiente para diferenciar 2 patrones en la evolución de la cicatrización de la sutura anastomótica. Así, los animales en que se habían utilizado hilos de sutura convencionales (Grupo B) presentan un mayor grado de inflamación general y un mayor número de estructuras adheridas al intestino, que aquellos animales en que la cirugía se realizó utilizando el biomaterial para sutura de la invención (Grupo A).

En primer lugar, se determinó que el manejo quirúrgico del biomaterial para sutura de la invención es idéntico al de los hilos convencionales. La presencia de células tapizando los hilos no altera la manejabilidad de las suturas.

Con el objetivo de valorar la cicatrización de la sutura anastomótica, se determinaron de una serie de variables:

1. Dehiscencia: En ninguno de los grupos se observó presencia de material fecal en la cavidad peritoneal. Para el tipo de rata utilizado, la técnica quirúrgica así como el material de sutura empleados eran adecuados.
2. Dilatación: En ambos grupos se observó dilatación del colon pre-anastomótico en un 75% de los casos.
3. Obstrucción: Aunque la dilatación del segmento pre-anastomótico era similar en ambos grupos, la repercusión clínica fue distinta. Así, el 100% de los animales del grupo tratado quirúrgicamente con el biomaterial de la invención (Grupo A) no presentaban obstrucción intestinal, mientras que había obstrucción en el 50% de los animales tratados con suturas convencionales (Grupo B). La no existencia de obstrucción cólica implica una serie de ventajas clínicas en cuanto a rapidez en la recuperación del paciente y reducción de complicaciones post-operatorias.
4. Adherencias Generales: Una valoración cualitativa del número de adherencias de la cavidad peritoneal muestra que en el Grupo A un 75% de los casos presenta adherencias loco-regionales, mientras que en el Grupo B un 75% de los casos presentan adherencias difusas.
5. Separación de adherencias: En el Grupo A un 75% de los casos pertenecen al nivel 1, las adherencias se separan fácilmente. Un único caso (25%) se ha clasificado en el nivel 3, siendo necesario para su separación el uso de instrumentos de corte. No obstante, este animal presentaba como particularidad que la colocación del ciego había sido invertida durante la intervención. Por el contrario, el 100% de los casos del Grupo B pertenecen al nivel 3.
6. Estructuras adheridas: En el Grupo A, el epiplón se encuentra adherido en un 75% de los casos y el 100% de los casos presentan adherencias a 2 estructuras distintas. El 100% de los casos del Grupo B presentan adherido el epiplón y el intestino delgado. En un 75% de los casos se observan adherencias a 3 estructuras distintas y el caso restante presenta adherencias a 4 estructuras distintas.

Las adherencias tienen importancia patológica debido a que alteran la fisiología normal de las superficies serosas. Sorprendentemente, los animales pertenecientes al Grupo A presentan un patrón de adherencias más regionales, más fáciles de separar y un menor número de estructuras adheridas, lo cual implica una reducción de las complicaciones originadas por las adherencias intraperitoneales: obstrucción intestinal, dolor crónico abdominal e infertilidad. La utilización de un material extraño en la cavidad abdominal produce un nivel de adherencias elevado (Bilis H, 1962, Zarapico *et al.*, 1972). La disminución de las adherencias observada en el ensayo podría ser debida a que el biomaterial de la invención no es reconocido como algo extraño por el organismo.

La utilización de un método físico para la valoración de la cicatrización de la anastomosis, tiene por objeto que ésta sea lo más global posible, ya que el uso de otros métodos como pueden ser los bioquímicos o histológicos, nos dan una visión parcial de estos procesos a nivel de la anastomosis.

La resistencia física de una sutura cólica ante los incrementos de presión intraluminal, varía según el tiempo transcurrido desde su realización. Así, se ha observado que tras las primeras horas de postoperatorio se produce un descenso en la resistencia, detectándose los valores más bajos entre el tercer y cuarto día del postoperatorio. A partir de este momento se produce un rápido aumento de la resistencia, alcanzándose al séptimo día del postoperatorio, valores cercanos a los de la resistencia de la pared cólica en estado fisiológico (figura 5). Esta inflexión de la curva de fuerza anastomótica alrededor del cuarto día postoperatorio está íntimamente relacionada con los procesos celulares y químicos que tienen lugar a lo largo del proceso inflamatorio y reparador.

En el Grupo A, la resistencia media de las anastomosis, calculada como presión de ruptura, es de 46,1575 mmHg, siendo superior a la resistencia media encontrada en el Grupo B: 44,7325 mmHg.

La medición de la resistencia a la presión intraluminal mediante determinación de la presión de ruptura, presenta el inconveniente de no tener en cuenta el diámetro de ese segmento del colon. Si medimos la presión de ruptura sin tener en cuenta el diámetro del segmento del colon, dejamos a un lado la Ley de Laplace ($T = P \times r$) y no consideramos el hecho de que para una misma presión de ruptura la tensión que soporta la pared es mayor en la zona de mayor radio (Asencio F. *et al*, 1989).

Al realizar el cálculo de la tensión de ruptura media, comprobamos que en el Grupo A la pared intestinal soporta una tensión de ruptura media de 1821.22 dinas/cm, siendo superior a la resistencia media encontrada en el Grupo B: 1631.57 dinas/cm.

Así, a pesar de que no existen diferencias estadísticamente significativas a nivel de presión de ruptura, el cálculo de la tensión de ruptura corroboró los resultados obtenidos: la sutura realizada con el biomaterial de la invención presenta una mayor resistencia a la presión que la realizada con hilos de sutura convencionales. Además, el valor máximo de resistencia a la ruptura correspondió a uno de los animales pertenecientes al grupo A y el valor mínimo quedó incluido en el grupo B. Una mayor resistencia a la ruptura de la sutura anastomótica implica un menor riesgo de dehiscencia, separación de una parte de la anastomosis, la cuál es una complicación severa y constituye una de las principales causas de muerte en el postoperatorio de cirugía cólica.

Referencias

- Aronson SB, Mc Master PR, Moore TE Jr, Coon MA. Toxicity of the cyanoacrylates. *Arch Ophthalmol*. 1970 Sep; 84(3):342-9.
- Asencio Arana F., Martinez Soriano F., Fenollosa Vazquez R. Aproximación a los estudios de las anastomosis intestinales experimentales. Métodos bioquímicos, físicos y microangiográficos. *Cir Esp* 1989; 46:805-810
- Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, Leboy PS, Owen ME. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Sci*. 1992 Jun; 102 (Pt 2):341-51.
- Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991 Sep; 9(5):641-50.
- De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs*. 2003; 174(3):101-9.
- Ellis H. The aetiology of postoperative abdominal adhesions. An experimental study. *Br J Surg* 1962; 50:10-16
- Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol*. 1976; 47:327-59.
- Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone*. 1992; 13(1):81-8.
- Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. *In vitro* chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res*. 1998 Jan 10; 238(1):265-72.
- Milde LN. An anaphylactic reaction to fibrin glue. *Anesth Analg*. 1989 Nov; 69(5):684-6.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 Apr 2; 284 (5411):143-7.
- Ravo B: Colorectal anastomotic healing and intracolonic bypass procedure. *Surg Clin North Am* 1988; 68:1267-1294
- Verreet PR, Fakir C, Ohmann C, Roer HD. Preventing recurrent postoperative adhesions: An experimental study in rats. *Eur Surg Res* 1992; 21: 267-273.
- Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve*. 1995 Dec; 18(12):1417-26.
- Zarapico Romero M, Saez López de Rueda F. La asociación fibrinodesoxirribonucleasa en la profilaxis de las adherencias peritoneales post-operativas. *Rev Fac Med Sevilla* 1972; 20: 347-362.
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002 Dec; 13(12):4279-95.

ES 2 264 862 A1

■ **Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH.** Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001 Apr; 7(2):211-28

TABLA I

5

10

15

20

25

30

Nº. Nombre	Naturaleza	Marca	Referencia
1. VICRYL	Polyglactin 910. Trenzado. Violeta. Sutura absorbible	ETHICON	V460
2. DEXON II	Ácido poliglicólico. Trenzado. Verde. Sutura absorbible	USS-DG	9819-41
3. MONOCRYL	Poliglecaprone 25. Monofilamento. Violeta. Sutura absorbible	ETHICON	Y3110
4. SAFILQUICK	Acido poliglicólico. Trenzado. Blanco. Sutura absorbible	B/BRAUN	0046030
5. ETHILON	Polyamide 6. Monofilamento. Azul. Sutura no absorbible	ETHICON	W1621

35

(Tabla pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

Tabla II

ANIMAL	INFLAMACIÓN		ADHERENCIAS			RESISTENCIA		TR (dinas/cm)	
	De	Di	Ob	AG	Se	EA	PR (mmHg)		r (cm)
1	NO	NO	NO	2	1	1,3	43,1	0,038	2178,27
4	NO	SI	NO	2	1	1,2	41,73	0,035	1942,53
6	NO	SI	NO	2	1	2,4	63,1	0,022	1846,2
7 ^a	NO	SI	NO	3	3	1,2	36,7	0,027	1317,89
MEDIA							46,1575		1821,22
2	NO	SI	SI	3	3	1,2,3,4	52	0,024	1646
3	NO	SI	NO	2	3	1,2,3	50,47	0,035	2349,38
5 ^b	NO	NO	NO	3	3	1,2,3	52,06	0,025	1758,69
10	NO	SI	SI	3	3	1,2,4	24,4	0,024	772,23
MEDIA							44,7325		1631,575

Grupo A: 1,4,6,7

Grupo B: 2,3,5,10

Tstudent 0,878536971

0,62896192

OBSERVACIONES:

a ciego invertido

b 7 puntos sutura

Abreviaturas:

Dehiscencia clínica (De)

Dilatación (Di)

Obstrucción (Ob)

Adherencias generales (AG)

Separación de las adherencias generales (Se)

Estructuras adheridas (EA)

Presión de ruptura (PR)

Radio (r)

Tensión de ruptura (TR)

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Biomaterial para sutura que comprende:
- a. un material de soporte,
 - b. una población celular que comprende células madre adultas multipotentes, con capacidad proliferativa y/o de diferenciación recubriendo dicho material de soporte.
- 10 2. Biomaterial, según la reivindicación 1, en el que el material de soporte son hilos absorbibles o no absorbibles.
3. Biomaterial, según las reivindicaciones 1-2, en el que el material de soporte son hilos de origen natural o de origen sintético.
- 15 4. Biomaterial, según las reivindicaciones 1-3, en el que el material de soporte son hilos de estructura monofilamento o de estructura multifilamento.
- 20 5. Biomaterial, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el material de soporte es un hilo de sutura unido a una aguja.
6. Biomaterial, según la reivindicación 1, en el que el material de soporte son grapas.
- 25 7. Biomaterial, según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la población celular de recubrimiento comprende células madre adultas multipotentes de origen mesodérmico.
8. Biomaterial, según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en el que la población celular de recubrimiento comprende células madre adultas multipotentes derivadas de tejido adiposo.
- 30 9. Biomaterial, según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la población celular de recubrimiento del material de soporte comprende células que expresan, al menos, una característica propia de una célula especializada.
- 35 10. Biomaterial, según la reivindicación 9, en el que la población celular de recubrimiento del material de soporte es seleccionada entre células que expresen al menos una característica propia de célula epitelial o de célula endotelial o de adipocito o de miocito o de condrocito o de osteocito o de neurona o de astrocito o de oligodendrocito o de hepatocito o de célula pancreática.
- 40 11. Biomaterial, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la población celular de recubrimiento del material de soporte es una población celular heterogénea.
12. Biomaterial, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la población celular de recubrimiento del material de soporte comprende células genéticamente modificadas.
- 45 13. Biomaterial, según la reivindicación anterior, en el que la población celular de recubrimiento del material de soporte comprende células modificadas con un gen que codifica una proteína implicada en reparación tisular.
14. Biomaterial, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la población celular de recubrimiento del material de soporte comprende una población celular autóloga o alogénica o xenogénica o bien una combinación de éstas.
- 50 15. Método de preparación de un biomaterial, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende:
- Expansión de la población celular de elección.
 - 55 ▪ Inmersión del material de sutura en un medio de cultivo adecuado para dicha población celular.
 - Inoculación de una suspensión de la población celular pre-cultivada sobre el material de sutura.
 - Cultivo de la preparación anterior en condiciones adecuadas.
 - 60 ▪ Aislar el material de sutura que presente un recubrimiento celular adecuado.
16. Método de preparación de un biomaterial para sutura, según la reivindicación anterior, en el que la población celular de recubrimiento se une al material de soporte mediante adhesión.
- 65 17. Método de preparación de un biomaterial, según la reivindicación 16, que comprende además un recubrimiento previo de la superficie del material de soporte que facilite la adherencia de la población celular.

ES 2 264 862 A1

18. Método de preparación de un biomaterial, según la reivindicación 17, en el que dicho material de recubrimiento es seleccionado del grupo constituido por: péptidos, antígenos proteicos, azúcares y lípidos.

5 19. Método de preparación de un biomaterial, según la reivindicación 17, en el que dicho material de recubrimiento son proteínas de matriz extracelular de células eucariotas o anticuerpos.

20. Biomaterial para sutura, según las reivindicaciones 1-14, para su uso en terapia.

10 21. Biomaterial para sutura, según las reivindicaciones 1-14, para su uso en la aproximación de los bordes tisulares en sutura de heridas, accidentales o quirúrgicas, y en reparación de tejidos.

15 22. Biomaterial para sutura, según las reivindicaciones 1-14, para su uso en hemostasis, trasplante de órganos, cirugía del tracto gastrointestinal, cirugía del tracto urogenital, cirugía del tracto respiratorio, cirugía ocular, cirugía vascular, cirugía plástica, cirugía en tejido muscular, en tejido epitelial, en tejido nervioso, así como en reparación de tendones, tejido óseo y tejido cartilaginoso.

20 23. Biomaterial para sutura, según las reivindicaciones 1-13, que comprende una población celular de recubrimiento del material de soporte autóloga para su uso en los casos en que la reacción inflamatoria local generada pueda perjudicar los resultados de la intervención quirúrgica.

24. Uso del biomaterial para sutura, según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, para su uso en la elaboración de un material útil en la aproximación de los bordes tisulares en sutura de heridas, accidentales o quirúrgicas, y en reparación de tejidos.

25 25. Uso del biomaterial para sutura, según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, para su uso en la elaboración de un material útil en la aproximación de los bordes tisulares en anastomosis intestinales.

26. Uso del biomaterial para sutura, según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en la sujeción de prótesis.

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

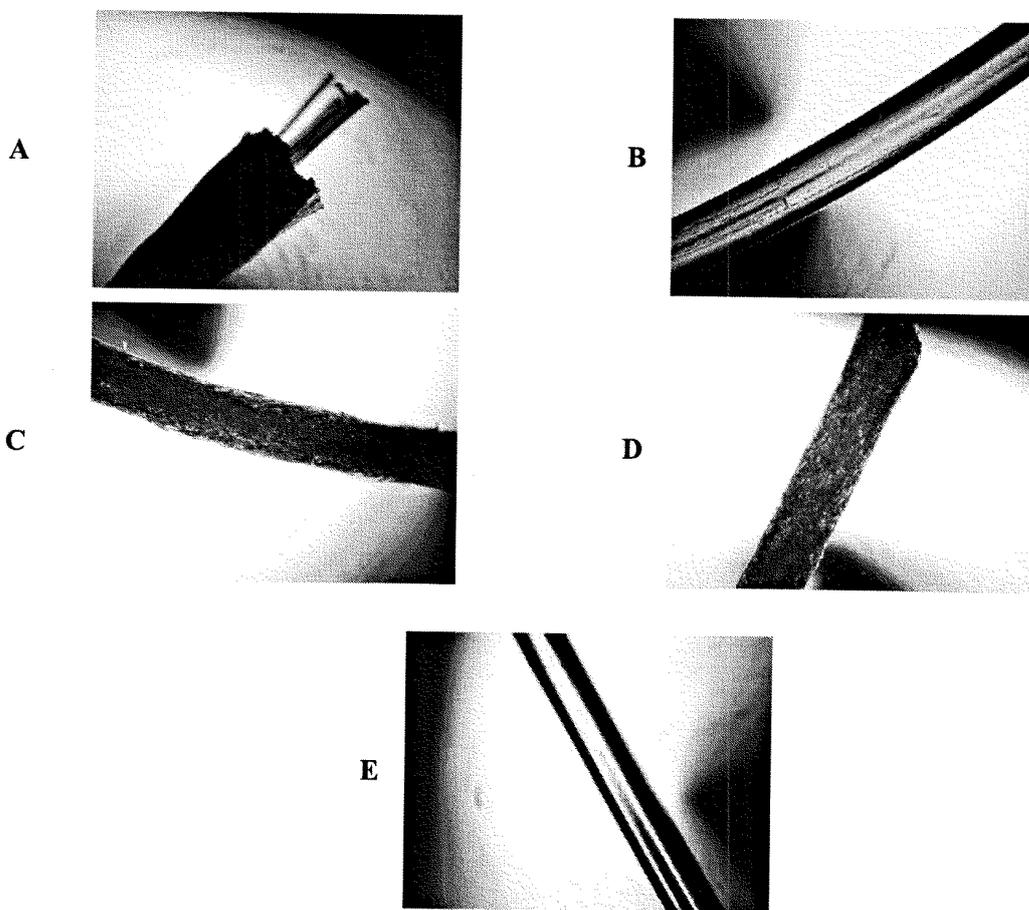


Figura 2

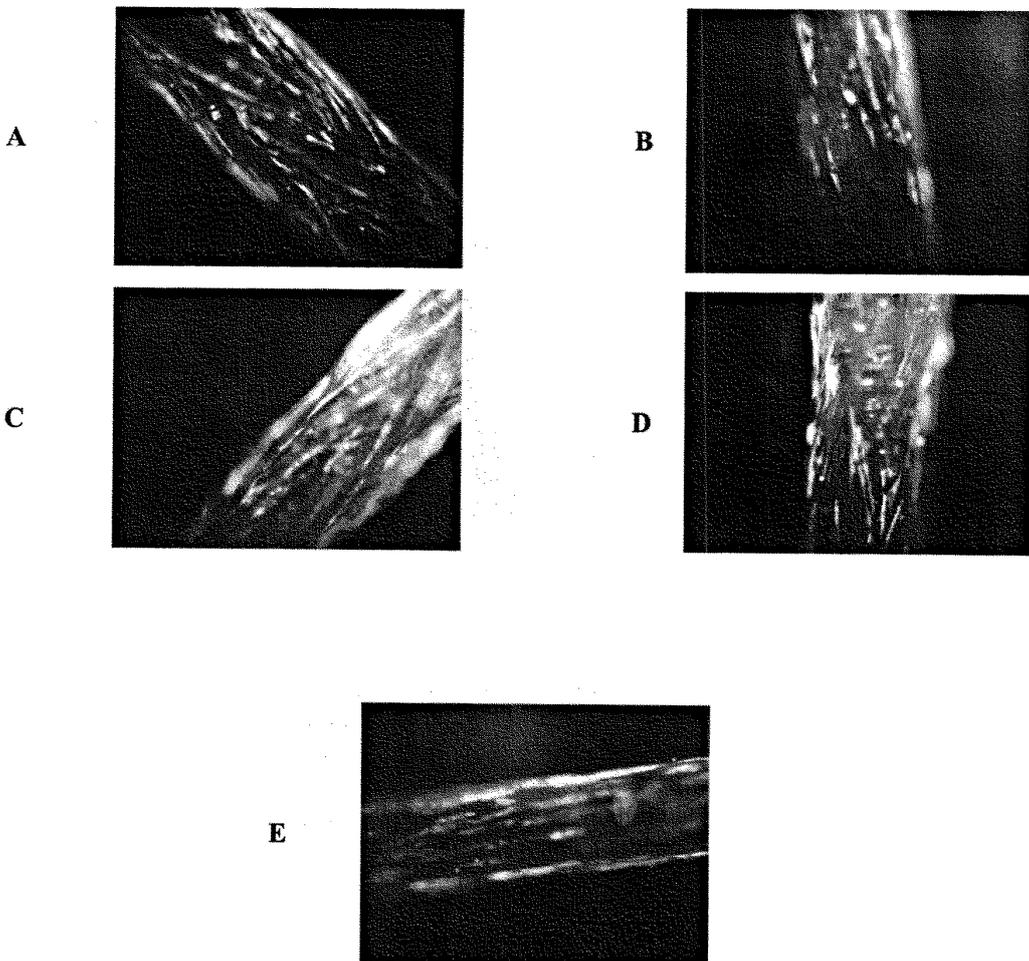


FIGURA 3a



FIGURA 3b

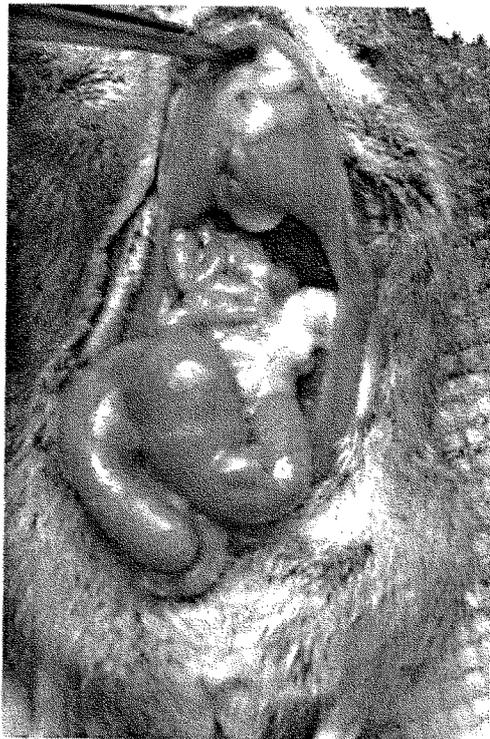
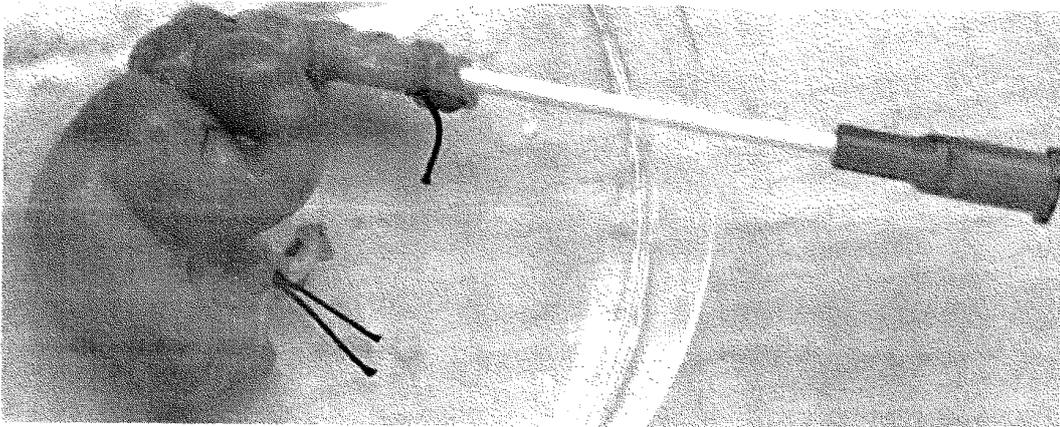
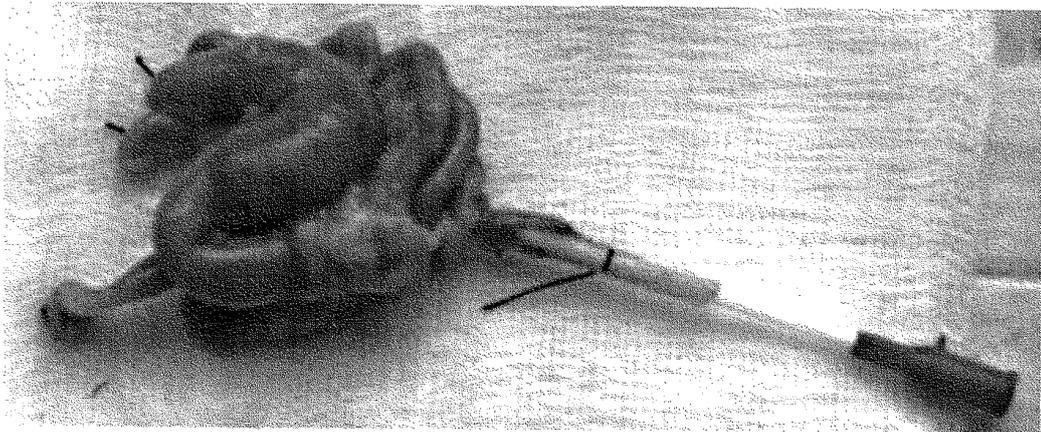


FIGURA 4a



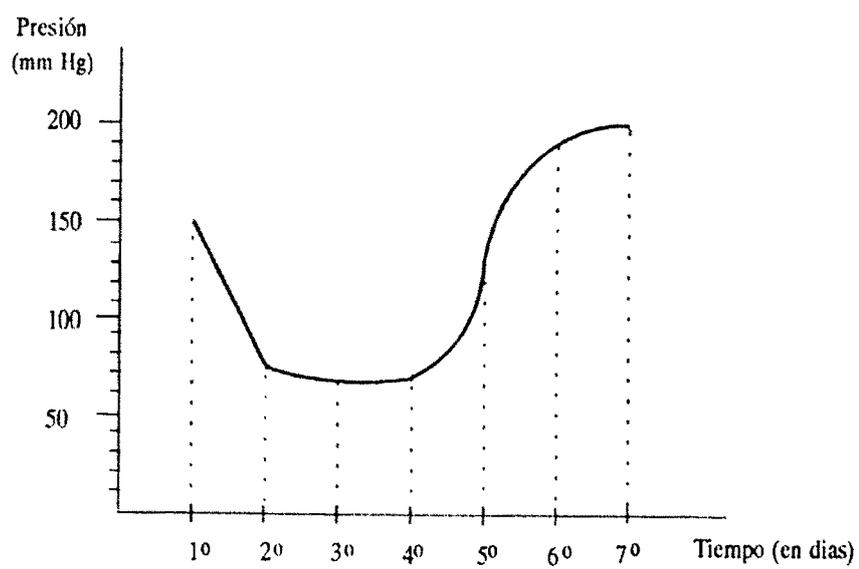
7 mm

FIGURA 4b



7 mm

FIGURA 5





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 264 862

② Nº de solicitud: 200402083

③ Fecha de presentación de la solicitud: **25.08.2004**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A61L 17/00** (2006.01)
C12N 5/08 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	VAN EIJK, F. et al. "Tissue Engineering of Ligaments: A Comparison of Bone Marrow Stromal Cells, Anterior Cruciate Ligament, and Skin Fibroblasts as Cell Source."Tissue Engineering, MAYO 2004, 10 (5/6), 893-903.	1-26
X	AWAD, HANI A. et al. Repair of patellar tendon injuries using a cell-collagen composite."Journal of Orthopaedic Research, (2003), 21 (3), 420-431.	1-26
X	US 5855619 A (CAPLAN et al.) 05.01.1999	1-26
X	KIM, DONG-IK et al. Comparative study of seeding and culture methods to vascular smooth muscle cells on biodegradable scaffold."JournalNumber 4, páginas 707-714.	1-26

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

07.12.2006

Examinador

M. Hernández Cuéllar

Página

1/1