



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 443**

51 Int. Cl.:
A61L 27/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07721969 .9**

96 Fecha de presentación : **28.02.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **1989293**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.11.2008**

54 Título: **Constructos de trasplante tisular prevascularizados para la reconstrucción de un órgano humano o animal.**

30 Prioridad: **28.02.2006 DE 10 2006 009 539**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.05.2011

73 Titular/es: **UROTEC GmbH**
Budapester Strasse 3
01069 Dresden, DE

72 Inventor/es: **Ram-Liebig, Gouya y**
Wirth, Manfred

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 359 443 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Constructos de trasplante tisular prevascularizados para la reconstrucción de un órgano humano o animal.

- 5 La invención concierne a constructos de trasplante tisular para la reconstrucción de un órgano humano o animal, a un procedimiento para fabricar un constructo de trasplante tisular de esta clase y a usos del constructo de trasplante tisular. La invención concierne especialmente a un constructo de trasplante tisular para la reconstrucción de los órganos urológicos inferiores y especialmente de la vejiga de la orina.
- 10 El objetivo de la arquitectura tisular (“tissue engineering”) es la sustitución de tejido corporal dañado, lesionado o faltante por un material protésico biológicamente compatible. Actualmente, para acelerar la regeneración de tejidos, se investigan en la arquitectura tisular tanto la técnica de revestimiento celular como la técnica sin revestimiento celular (Alberti et al., 2004). La técnica de revestimiento celular (o arquitectura tisular celular) utiliza membranas biológicamente degradables que se han revestido *in vitro* con células primariamente cultivadas, habiéndose obtenido
- 15 las células por medio de una biopsia de tejido huésped nativo. Este trasplante compuesto se pone después en el huésped para proseguir el proceso regenerativo. La técnica sin revestimiento celular comprende el emplazamiento directo *in vivo* de un material biológicamente degradable no revestido en el huésped, el cual deberá funcionar entonces como armazón para que pueda tener lugar el proceso de regeneración natural *in vivo*. Estas técnicas fomentan una regeneración tisular que se asemeja al desarrollo embrionario normal del órgano de interés.
- 20 Los materiales biológicos acelulares muestran buenos resultados en la generación tisular *in vivo* como membranas revestidas con células y no revestidas con células (Atala et al., 2000). En realidad, estos materiales biológicamente degradables se han empleado en la arquitectura tisular de órganos diferentes como un material natural, degradable y poroso y son conocidos por proporcionar *in vitro* señales biológicamente específicas para la interacción molecular con las células cultivadas y, además, para interaccionar con las células del tejido diana después de la implantación.
- 25 Sin embargo, cuando ya se ha implantado el trasplante en el huésped, la capacidad de mantener vivas las células que han crecido *in vitro* sobre la superficie o dentro de la matriz (técnica de revestimiento celular) o que se infiltran en la matriz después de la implantación (técnica sin revestimiento celular) constituye un obstáculo crítico. Se ha visto que un trozo del tejido con un volumen que sobrepase unos pocos milímetros cúbicos no puede sobrevivir por difusión de nutrientes, sino que requiere la presencia de capilares sanguíneos para la alimentación de nutrientes importantes y oxígeno (Mooney et al., 1999). Por tanto, la vascularización retardada puede ocasionar un fallo del implante. Hasta hoy, los éxitos de las técnicas de implantación se han limitado a estructuras relativamente delgadas o avasculares (por ejemplo, piel y cartilago), en donde la formación de vasos por el huésped después de la implantación es suficiente para satisfacer los requisitos del implante en materia de oxígeno y nutrientes (Jam et al., 2005). La vascularización sigue siendo un obstáculo crítico para el desarrollo de órganos más gruesos y metabólicamente exigentes, tales como el corazón, el cerebro y la vejiga de la orina.
- 30 La capacidad de prevascularización de armazones tisulares es una estrategia en principio terapéutica y supone un paso significativo en la técnica tisular debido a que se evita una regeneración tisular restringida. Una matriz prevascularizada acelera su vascularización y mejora su riego sanguíneo y su supervivencia *in vivo*. Los tejidos y órganos especialmente complejos necesitan un abastecimiento vascular para garantizar la supervivencia del trasplante y para hacer que los órganos bioartificiales sean capaces de funcionar (Mertsching et al., 2005). Un método de neovascularización es la formación de vasos nuevos a partir de células endoteliales. Este procedimiento, que se denomina vasculogénesis (formación de vasos), tiene lugar normalmente durante el desarrollo embrionario al formar
- 40 órganos (Risau et al., 1995).
- 45 Es de especial importante la prevascularización de materiales para la reconstrucción de las vías urinarias inferiores (vejiga de la orina, uréter y uretra). Estos órganos presentan un rico abastecimiento a través de vasos sanguíneos. En la técnica de revestimiento celular de la arquitectura tisular de los órganos urinarios inferiores los ensayos se han limitado hasta ahora únicamente al cultivo de células uroteliales y células musculares (Alberti et al., 2004) sobre membranas biológicas. Estas células pueden cosecharse fácilmente en pequeñas biopsias de la vejiga.
- 50 La cuestión abierta es actualmente qué clase de células endoteliales pueden emplearse para la prevascularización de armazones biológicos que deben implantarse *in vivo*. Es sabido que los fenotipos de células endoteliales varían fuertemente en función del tipo de vaso y del órgano y que esta especificidad tisular juega un papel importante en la fisiología local de los órganos (Jam et al., 2005).
- 55 Schultheiss et al. describen en “Biological vascularized matrix for bladder tissue engineering: matrix preparation, reseeded technique and short-term implantation in a porcine model”, J. Urol. Enero de 2005; 173 (1): 276-80, una matriz acelular biológica que está colonizada con células de músculo liso, células uroteliales y células precursoras endoteliales. Las células precursoras se han obtenido a partir de fracciones de glóbulos sanguíneos. Para fabricar un constructo de trasplante tisular se reviste la matriz con células precursoras endoteliales procedentes de la sangre, además de revestirla con células de músculo liso y células uroteliales. Sin embargo, estas células no están en condiciones de formar estructuras vasculares en la matriz. Además, las células precursoras endoteliales no son específicas de los órganos. Por otra parte, no son células endoteliales maduras.
- 60
- 65

El cometido de la invención consiste en eliminar los inconvenientes según el estado de la técnica. Se pretende indicar especialmente un constructo de trasplante tisular que, en el caso de un revestimiento de la membrana con células endoteliales (y la formación de estructuras vasculares dentro de la membrana), haga posible una generación rápida y mejor del tejido circundante en el armazón después de la implantación o que, en el caso de un revestimiento de la membrana con células endoteliales y con otras células específicas de órganos (como células uroteliales, células musculares y/o células intersticiales), haga posible un mejor abastecimiento de las células contenidas en ella después de la implantación.

Este problema se resuelve con las características de las reivindicaciones 1 y 7. Ejecuciones convenientes de la invención se desprenden de las características de las reivindicaciones subordinadas.

El documento US 2004/0006395 A1 describe una membrana que está colonizada exclusivamente con células endoteliales, pero en la que no están formadas estructuras microvasculares, ya que las células endoteliales no penetran en la membrana; o (ii) una membrana que está colonizada con células endoteliales y otras células (células de músculo liso y células 3T3) y en la que están formadas estructuras microvasculares.

Velazquez Omaidia C et al. (Database Biosis [Online] Biosciences Information Service, Filadelfia, PA, US, Agosto de 2002 (08-2002), "Fibroblast-dependent differentiation of human microvascular endothelial cells into capillary-like 3-dimensional networks" (No de acceso a banco de datos PREV200200441299), revelan que se recubren células endoteliales con colágeno humano I y con una segunda capa de colágeno con fibroblastos incrustados para formar redes tridimensionales similares a capilares.

Hopkins Richard et al. (www.oulo.fi) revelan un método para acelerar la proliferación de células HUVEC sobre colágeno reticulado con ayuda de células madre de médula ósea mesenquimales y fibroblastos dermales.

El documento US 2001/051824 A1 presenta una membrana que ha sido colonizada con miofibroblasto. El cultivo de los miofibroblastos se efectúa en condiciones de flujo pulsante. La membrana puede colonizarse también, además, con células endoteliales.

El documento DE 10 2004 037 184 B3 revela un procedimiento para fabricar un constructo de implante tisular que comprende (a) la aplicación de células específicas del órgano (concretamente se revelan células uroteliales en el ejemplo allí expuesto) sobre una membrana biológica, (b) la proliferación de estas células bajo inducción estromal y (c) la diferenciación terminal de una parte de las células uroteliales expandidas, con lo que se obtiene una membrana que presenta varias capas de células uroteliales.

Según la invención, se ha previsto un constructo de trasplante tisular para la reconstrucción de un órgano humano o animal, que consta de

(a) una membrana acelular biológicamente compatible; y

(b) células endoteliales microvasculares que atraviesan la membrana, siendo las células endoteliales microvasculares células endoteliales microvasculares dermales o células endoteliales microvasculares de la vejiga;

en donde están formadas dentro de la membrana estructuras microvasculares constituidas por las células endoteliales microvasculares.

Las estructuras microvasculares, que están formadas por las células endoteliales microvasculares aplicadas, hacen posible un abastecimiento de las restantes células de los órganos urinarios inferiores, especialmente de las células uroteliales, las células musculares, las células intersticiales, después de la implantación del constructo, con nutrientes y oxígeno. Asimismo, se abastecen también otras células que penetran en el constructo después de la implantación.

El constructo de trasplante tisular según la invención puede comprender otras células específicas del tejido, por ejemplo células uroteliales y/o células de músculo liso y/o células intersticiales, que se han aplicado sobre la membrana antes de la implantación y que se han cultivado allí. Estas células son abastecidas también por la estructura microvascular después de la implantación del constructo de trasplante tisular.

Por tanto, la invención proporciona por primera vez un constructo de trasplante tisular que hace posible un abastecimiento de las células dentro del constructo y no solo en su superficie. Por consiguiente, los constructos son especialmente adecuados para la reconstrucción de órganos.

La invención emplea especialmente células endoteliales microvasculares de la vejiga de la orina específicas del órgano (células endoteliales de vejiga microvasculares) para la prevascularización de matrices que deberán emplearse para la reconstrucción de los órganos urinarios inferiores. Las células endoteliales de vejiga microvasculares han podido aislarse de un pequeño material de biopsia de este órgano y han podido emplearse para formar redes de

vasos endoteliales en diferentes matrices acelulares biológicas. Matrices preferidas son una matriz de vejiga acelular, una matriz de uretra acelular, una submucosa de vejiga acelular, una submucosa de intestino delgado, una matriz de piel acelular, una matriz de aorta acelular.

5 Como alternativa a células endoteliales de vejiga microvasculares se pueden emplear también células endoteliales microvasculares dermales. Las células endoteliales microvasculares dermales pueden emplearse también para la fabricación de un constructo de trasplante tisular que puede utilizarse para la reconstrucción de los órganos urinarios inferiores, pero también de otros órganos. Sin embargo, para la reconstrucción de la vejiga de la orina se prefiere el empleo de células endoteliales de vejiga microvasculares debido a la especificidad del tejido.

10 La invención hace posible especialmente el cultivo *in vitro* de células endoteliales microvasculares sobre diferentes matrices biológicas y la formación de una construcción de red vascular estable para la reconstrucción de tejido de partes blandas, especialmente de la vejiga de la orina, el uréter y la uretra. El cultivo se efectúa en sistemas de cultivo que proporcionan factores de crecimiento angiogénicos para inducir la prevascularización de matrices con células endoteliales de vejiga microvasculares. La formación de estructuras de vasos en los constructos de trasplante tisular terminados se induce por medio de células estromales de vejiga, células progenitoras estromales de médula ósea y células uroteliales de vejiga, especialmente con un medio que ha sido acondicionado con estas células. Las células estromales, las células progenitoras estromales de médula ósea y las células epiteliales, tales como las células uroteliales, son conocidas por estar vinculadas con la inducción de la formación de vasos sanguíneos *in vitro* (Velazquez et al., 2002; Markowicz et al., 2005; Thompson et al., 2006).

Sin embargo, la invención no se limita a un constructo de trasplante tisular para reconstruir los uréteres inferiores, sino que puede transferirse también a otros órganos, especialmente órganos de partes blandas.

25 El término “específico del órgano” deberá entenderse aquí de modo que se apliquen sobre la membrana células del mismo órgano o de un órgano idéntico que deba reconstruirse. Si, por ejemplo, se debe reconstruir una vejiga de orina, han de entenderse aquí por células endoteliales microvasculares específicas del órgano las células endoteliales microvasculares proveniente de la vejiga de la orina.

30 Los órganos son unidades funcionales del cuerpo. Un ejemplo preferido es la vejiga de la orina.

Bajo el término “estructura microvascular” ha de entenderse la formación de una estructura capilar dentro de la membrana. Una estructura capilar consiste preferiblemente en unidades de forma de cordón y/o de forma de tubo que están formadas por células endoteliales microvasculares. Las unidades de forma de tubo presentan preferiblemente lúmenes completamente formados. Las unidades de forma de cordón y/o de forma de tubo están preferiblemente reticuladas una con otra. Después de la implantación del constructo según la invención en el órgano a reconstruir y de la unión de la estructura de vasos microvascular del constructo con la estructura de vasos *in vivo* se asegura el abastecimiento de las células endoteliales y otras células del constructo. Por tanto, el constructo puede abastecerse inmediatamente después de la implantación con nutrientes y oxígeno a través de las estructuras microvasculares. El proceso de formación de vasos sanguíneos se denomina también vascularización. Por prevascularización se entiende que la estructura microvascular ya está presente antes de la implantación.

45 Los términos “membrana” y “matriz” se emplean aquí como sinónimos, siempre que no se indique otra cosa. La membrana deberá contener los componentes de la matriz extracelular (ECM), especialmente sus factores de crecimiento. Preferiblemente, la membrana es una membrana biológica. La membrana forma el armazón biológico tridimensional en el que penetran las células endoteliales microvasculares aplicadas durante el cultivo.

50 La membrana consiste preferiblemente en una vejiga de orina humana o porcina acelular, submucosa de vejiga de orina humana o porcina acelular, dermis humana o porcina acelular, intestino delgado humano o porcino acelular, aorta humana o porcina acelular o uretra humana o porcina acelular. La membrana contiene colágeno. Convenientemente, la membrana es mecánicamente estable.

55 La superficie exterior de la membrana tiene preferiblemente un tamaño de hasta 40 cm², pero puede ser también mayor. El espesor de la membrana está comprendido preferiblemente entre 100 µm y 100 mm.

Por reconstrucción se entiende la sustitución de zonas dañadas o enfermas de un órgano humano o animal, especialmente una vejiga de orina, una uretra o un uréter.

60 El término “penetración” deberá entenderse aquí en el sentido de que células endoteliales microvasculares han penetrado desde la superficie de la membrana en el interior de ésta y el interior de la membrana está colonizado por las células endoteliales microvasculares. El término “penetración” deberá corresponder aquí al término “invasión”.

65 Por inducción estromal se entiende la proliferación de las células endoteliales microvasculares inducidas por la estroma. Preferiblemente, la inducción estromal es una inducción por medio de células estromales de vejiga y células progenitoras estromales de médula ósea.

Por inducción epitelial se entiende la proliferación de las células endoteliales microvasculares inducida por células epiteliales. En el caso de las vías urinarias inferiores, las células epiteliales son células uroteliales, de modo que se habla entonces de inducción urotelial.

5 Por inducción epitelial-estromal se entiende la proliferación de células endoteliales microvasculares que es inducida por una mezcla de células estromales y células epiteliales. Preferiblemente, la inducción urotelial-estromal es una inducción por medio de células uroteliales-estromales de vejiga. En el caso de las vías urinarias inferiores, las células epiteliales son células uroteliales, de modo que se habla entonces de inducción urotelial-estromal.

10 Una mezcla de células estromales de vejiga y células uroteliales de vejiga se denomina seguidamente también células uroteliales-estromales de vejiga, células uroteliales-estromales, células estromales-uroteliales o células uroteliales de vejiga-estromales.

15 Una vejiga de orina consta de mucosa (células uroteliales) y estroma (fibroblastos, células de músculo liso y células endoteliales).

El constructo de trasplante tisular según la invención se emplea preferiblemente para reconstruir las vías urinarias inferiores, en particular preferiblemente la vejiga de la orina, la uretra o el uréter. En este caso, el órgano humano o animal que ha de reconstruirse es una vejiga de orina, mientras que las células endoteliales microvasculares específicas del órgano son células endoteliales de vejiga microvasculares y/o células endoteliales microvasculares dermales.

20 De manera especialmente preferida, las células endoteliales microvasculares son células endoteliales microvasculares autólogas, es decir que las células endoteliales microvasculares se aíslan del tejido de un paciente cuyo órgano debe reconstruirse con el constructo de trasplante tisular según la invención.

Preferiblemente también, se pueden aislar células endoteliales microvasculares de la piel y se pueden emplear éstas para prevascularizar la membrana.

30 Según la invención, se ha previsto también un procedimiento de fabricación del constructo de trasplante tisular para reconstruir un órgano humano o animal, en donde el constructo de trasplante tisular consta de una membrana y células endoteliales microvasculares, comprendiendo el procedimiento los pasos de

35 (a) aislar células endoteliales microvasculares dermales o células endoteliales de vejiga microvasculares;

(b) aplicar las células endoteliales microvasculares sobre una membrana acelular biológicamente compatible;

40 (c) cultivar en la membrana las células endoteliales microvasculares que se han aplicado sobre la membrana acelular biológicamente compatible, bajo inducción estromal o bajo inducción epitelial-estromal, con formación de estructuras microvasculares constituidas por células endoteliales microvasculares.

La inducción estromal se realiza preferiblemente empleando células estromales de vejiga humanas o animales o células progenitoras estromales de médula ósea humanas o animales.

45 El cultivo bajo inducción estromal se realiza de manera especialmente preferida con ayuda de un medio acondicionado, habiéndose acondicionado el medio acondicionado con ayuda de células estromales de vejiga humanas o animales o células progenitoras estromales de médula ósea humanas o animales. Se puede obtener un medio acondicionado cultivando un medio no acondicionado con células estromales de vejiga humanas o animales o células progenitoras estromales de médula ósea humanas o animales y retirando a continuación el medio como parte sobrante desde las células estromales de vejiga o las células progenitoras estromales de médula ósea. En lo que sigue el medio acondicionado se denomina también medio acondicionado con estroma o medio acondicionado con células estromales.

55 La inducción epitelial-estromal es preferiblemente una inducción urotelial-estromal que se realiza empleando células uroteliales-estromales de vejiga.

60 El cultivo bajo inducción epitelial-estromal se realiza de manera especialmente preferida con ayuda de un medio acondicionado, habiéndose acondicionado el medio acondicionado con ayuda de células epiteliales humanas o animales, especialmente células uroteliales, y células estromales de vejiga. Se puede obtener un medio acondicionado cultivando un medio no acondicionado con células epiteliales humanas o animales y retirando a continuación el medio como parte sobrante desde la mezcla de células epiteliales y células estromales.

65 El cultivo bajo inducción epitelial se realiza de manera especialmente preferida con ayuda de un medio acondicionado, habiéndose acondicionado el medio acondicionado con ayuda de células epiteliales humanas o animales, especialmente células uroteliales. Se puede obtener un medio acondicionado cultivando un medio no acondicionado con

células epiteliales humanas o animales y retirando a continuación el medio como parte sobrante desde las células epiteliales.

5 Se pueden obtener células endoteliales microvasculares a partir del tejido estromal del órgano a reconstruir (no perteneciente a la invención). Esto puede hacerse

(i) digiriendo el tejido estromal por medio de un apéndice de colágeno;

10 (ii) separando de la mezcla obtenida en el paso (i) las células endoteliales microvasculares mediante el empleo de partículas paramagnéticas acopladas con lectina o con anticuerpos, siendo los anticuerpos unos anticuerpos monoclonales para la molécula de adhesión plaqueta sanguínea-célula endotelial 1 (PECAM 1) o CD105;

(iii) multiplicando las células endoteliales microvasculares así obtenidas; y

15 (iv) separando de la mezcla obtenida en el paso (iii) las células endoteliales microvasculares mediante el empleo de partículas paramagnéticas acopladas con lectina o con anticuerpos, siendo los anticuerpos unos anticuerpos monoclonales para la molécula de adhesión plaqueta sanguínea-célula endotelial 1 (PECAM 1) o CD105 y siendo las células endoteliales microvasculares así obtenidas una mezcla con una pureza de al menos 95%, referido al número de todas las células separadas.

20 El resto de la mezcla que ha quedado en el paso (ii) se emplea de manera especialmente preferida para la preparación del medio acondicionado. Como alternativa, el resto de la mezcla puede cultivarse con células uroteliales sobre la membrana prevascularizada a continuación del paso (c) y, por tanto, puede formar un constructo de trasplante tisular vital complejo.

25 La invención ofrece la posibilidad de reconstruir las vías urinarias inferiores con las matrices biológicas prevascularizadas según la invención, en las que se comienza la generación de tejido *in vitro*, acelerándose al mismo tiempo la proliferación de células endoteliales de vejiga microvasculares y mejorándose su formación de microvasos. Aparte de las células endoteliales microvasculares, el constructo de trasplante tisular según la invención puede incluir otras células específicas del tejido, como células epiteliales y células estromales.

30 Los ventajosos resultados de las invenciones se basan en los conocimientos siguientes de los inventores: La angiogénesis es un complejo procedimiento que incorpora una matriz extracelular (ECM) y células endoteliales vasculares y que se regula por medio de diferentes factores angiogénicos. La capacidad para formar una red de forma de capilares/tubitos es una función especial de las células endoteliales (EC) y requiere una cascada especial de procesos, consistentes en invasión de células endoteliales, migración, proliferación, formación de tubitos y anastomosis entre las estructuras (Cameliet et al., 2000; Yancopoulos et al., 2000; Blau et al., 2001; Ferrara et al., 1999; Keshet et al., 1999). De esta manera, se conducen células endoteliales por medio de las señales provenientes del microentorno de la matriz que las rodea (Berthod et al., 2006).

35 Para fomentar la formación de microvasos y su conservación *in vitro* se emplea preferiblemente una matriz acelular de vejiga de orina o de uréter que comprende los componentes principales del intersticio de la vejiga o del uréter como matriz fisiológica para la invasión y diferenciación de células endoteliales. Preferiblemente también, pueden emplearse otras matrices acelulares biológicas que comprendan colágeno como componente principal, el cual es también el componente principal del intersticio. El hecho de que se haya observado la formación de estructuras microvasculares dentro de todas las matrices demuestra de que la capacidad de células endoteliales microvasculares humanas no se limita solamente a un tipo de matriz biológica.

40 Las células endoteliales son conocidas también por ser activadas por señales provenientes de otras células de su microentorno (Berthod et al., 2006; Velazquez et al., 2002). Las células estromales (fibroblastos y células de músculo liso) se adicionan frecuentemente a células endoteliales, lo que contribuye a la morfogénesis y a la diferenciación definitiva con respecto al fenotipo de forma de capilares/tubitos. Las células estromales y especialmente los fibroblastos están ligados a la producción de proteínas de matriz que sirven como armazón para la disposición de vasos y otras estructuras de órganos. Estas células son también una rica fuente de factores de crecimiento angiogénicos (Honorati et al., 2005) para dirigir la proliferación y diferenciación de células endoteliales (Erdag et al., 2004; Hudon et al., 2003) y para vincularlos con la estabilización de vasos sanguíneos *in vitro* (Velazquez et al., 2002). Asimismo, es sabido que las células epiteliales segregan factores de crecimiento que inducen una formación de vasos (Thompson et al., 2006).

45 Darland et al., 2001, observaron que las células estromales, al igual que los pericitos diferenciados, generan en cultivo con células endoteliales unos factores de crecimiento que fomentan la supervivencia y/o la estabilización de células endoteliales.

50 Las células madre mesenquimáticas adultas de médula ósea son células multipotentes y fuertemente proliferantes que pueden liberar factores de crecimiento diferentes (Tang et al., 2004) que fomentan la supervivencia y/o la estabi-

lización de células endoteliales (Markowicz et al., 2005). Estas células son conocidas por proporcionar un entorno local que fomenta el crecimiento de vasos sanguíneos hacia dentro de un sitio defectuoso (Gruber et al., 2005).

5 En la presente invención se ha analizado la acción de inducción de células estromales de vejiga, células progenitoras estromales de médula ósea y células uroteliales de vejiga por un medio de acondicionamiento (Velazquez et al., 2002); Gruber et al., 2005; Thompson et al., 2006). Se han empleado con este fin las sobras de células estromales provenientes de la médula ósea, células estromales de vejiga específicas del órgano y células uroteliales de vejiga específicas del órgano para acelerar la proliferación de células endoteliales de vejiga microvasculares aisladas y células endoteliales microvasculares dermales, que están adicionadas a los armazones biológicos, por medio de la función paracrina de las células estromales y las células uroteliales.

15 En ensayos que han servido de base para la invención se cultivaron primero como una monocapa sobre las matrices células endoteliales de vejiga microvasculares humanas o células endoteliales microvasculares dermales. A continuación, se alimentaron las células cultivadas con un medio acondicionado con estroma o con un medio acondicionado por vía urotelial-estromal. En ensayos de control se alimentaron las células cultivadas con un medio urotelialmente acondicionado o con un medio no acondicionado. Para determinar la capacidad de células estromales y células uroteliales para modular la proliferación, diferenciación y estabilización de células endoteliales microvasculares sobre materiales acelulares biológicamente degradables se valoró la angiogénesis *in vitro* por análisis histológicos e inmunohistoquímicos a fin de determinar la proliferación, penetración, formación de redes de capilares/tubitos y el fenotipo. Existen tres parámetros angiogénicos que se han propuesto en la literatura para el estudio de la formación de redes de tubitos: longitud de los capilares, número de capilares y rango relativo de los capilares. En estos ensayos realizados se obtuvo la longitud de los capilares en una muestra de ensayo (Watanable et al., 2005). Mediante análisis con microscópico óptico se determinó entonces la longitud de los capilares en tres respectivas secciones longitudinales histológicas de tres construcciones diferentes de las células, obtenidas en cada caso de una vejiga de la orina.

25 Los estudios histológicos e inmunohistoquímicos de células endoteliales microvasculares sobre matrices biológicas tridimensionales que se acondicionaron con células estromales y mezclas de células estromales y uroteliales, mostraron células invasivas activadas que degradaban su matriz pericelular, mientras que se obtuvo su fenotipo diferenciado. Tan pronto como se liberaron estas células hacia la matriz extracelular tridimensional, éstas comenzaron a migrar hacia otras células y se orientaron formando cordones de células endoteliales. Las formaciones de microtubitos crecieron una hacia otra y formaron anastomosis con otros microtubitos bajo señales paracrinas de citocina de células estromales y mezclas de células estromales y uroteliales. En comparación con este sistema, los cultivos que se cargaron con medios no acondicionados o solo con medios urotelialmente acondicionados mostraron solo un pequeño incremento del número de estructuras endoteliales, una menor superficie, que estaba cubierta por células endoteliales, y un menor porcentaje de estructuras a manera de vasos con lumen en comparación con cultivos acondicionados con estroma y cultivos acondicionados por vía urotelial-estromal.

35 El ensayo de proliferación con KI-67 demostró que en sistemas de cultivo no acondicionados o en sistemas de cultivo acondicionado solamente por vía urotelial, así como en sistemas de cultivo acondicionado por vía urotelial, las células endoteliales estaban latentes durante un espacio de tiempo de una a dos semanas, en gran parte dos semanas. En sistemas de cultivo acondicionado por vía estromal o por vía urotelial-estromal las células endoteliales seguían proliferando durante al menos cuatro semanas, lo que dio como resultado constructos con una mayor densidad de células que en el caso de constructos en sistemas de cultivo no acondicionados o solamente acondicionados por vía urotelial.

40 El ensayo para determinar la formación de redes de capilares/tubitos demostró también formaciones de capilares más largos por campo en los sistemas acondicionados por vía estromal o por vía urotelial-estromal.

45 Por tanto, las células estromales y la mezcla de células estromales y uroteliales proporcionan en su parte sobrante factores que pueden estimular la invasión de células endoteliales y la formación de estructuras de microtubitos. Estos resultados permiten deducir que las células estromales o las mezclas de células estromales y uroteliales proporcionan señales críticas con acciones endoteliales mitógenas y motógenas, lo que fomenta la constitución de estructuras de tubitos a base de células endoteliales.

50 El desarrollo de estructuras microvasculares capilares no solo requiere células estromales o una mezcla de células estromales y uroteliales, sino también la presencia de una matriz extracelular (ECM). En realidad, las células endoteliales no forman estructuras de tubitos bajo inducción estromal o bajo inducción urotelial-estromal en cubetas de cultivo convencionales bidimensionales. Los componentes ECM de las membranas biológicas pueden funcionar como almacén y también como inductor para células endoteliales. Evidentemente, en sinergia con la activación de las células endoteliales exponiéndolas a la matriz extracelular se proporcionan por medio de células estromales o mezclas de células estromales y uroteliales unas señales para acelerar la migración, la supervivencia y la diferenciación de las células endoteliales a fin de obtener una auténtica morfogénesis capilar.

60 El hecho es que una elevada proliferación y diferenciación de células endoteliales por efecto de medios que se han acondicionado con ayuda de células estromales de vejiga, células progenitoras estromales de médula ósea o una

mezcla de células uroteliales y células estromales no permite deducir ninguna especificidad de órgano respecto de las acciones sobre la morfología a manera de capilares proporcionada por las células estromales o las mezclas de células estromales y uroteliales e implica un papel crítico de las células estromales o de la mezcla de células uroteliales y células estromales en el control del comportamiento de la célula endotelial.

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) representa uno de los mitógenos de células endoteliales más eficaces (Pepper et al., 1992 – Lazarous et al., 1997). Éste está entre los factores que estimulan la expresión de metaloproteinasas de matriz, la proliferación, la migración y la formación de tubitos de células endoteliales aisladas *in vitro* y el desarrollo de vasos sanguíneos *in vivo* (Gruber et al., 2005).

Para determinar la presencia de este factor clave vasculógeno y angiógeno en los medios acondicionados se estudió la concentración del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en tests ELISA. Los resultados mostraron concentraciones detectables de VEGF que permiten deducir que se segregan concentraciones mensurables de esta citocina por células estromales. Por tanto, los constructos según la invención se basan especialmente en la capacidad de expresión de factores de crecimiento por células estromales y mezclas de células estromales y uroteliales. Respecto de este factor de crecimiento, las células uroteliales producían valores más altos. Los cultivos mixtos de células uroteliales y células estromales formaban la mayor cantidad de esta citocina, pudiendo medirse la mayor concentración de VEGF en el medio acondicionado con la mezcla de células estromales y uroteliales.

El hecho de que se indujeran poco la proliferación y la formación de tubitos-capilares por un medio acondicionado con solamente células uroteliales (a pesar de la producción de VEGF por estas células) denotaba que la presencia adicional de las células estromales es ventajosa para la inducción de las células endoteliales. Por tanto, la acción inductora de células estromales a su vez puede ser incrementada por las células uroteliales.

Por otro lado, después del cultivo de las células endoteliales microvasculares como capa individual sobre las matrices acelulares, el cultivo adicional sin medio acondicionado (es decir, sin inducción estromal o urotelial-estromal) o con un medio acondicionado solo por vía urotelial condujo al desprendimiento de células desde la capa individual y a la invasión de la matriz por estas células, pero la invasión de la matriz subyacente no fue tan alta como en circunstancias acondicionadas con células estromales o con una mezcla de células estromales y uroteliales. Además, las células endoteliales se dispusieron tan solo en pocos cordones polarizados como una pequeña ramificación y solamente unos pocos de ellos mostraron un lumen completamente formado. Por tanto, la matriz acelular es esencial para la migración inicial hacia la capa acelular inferior, pero no es suficiente para fomentar la locomoción adicional y para formar estructuras de tubitos maduras dentro de la matriz acelular. Estos resultados muestran que la inducción estromal o la inducción urotelial-estromal es necesaria para la adecuada migración e invasión y para la formación de estructuras lumenares maduras.

En conjunto, los resultados *in vitro* en los que se basa la invención muestran que la prevascularización de matrices biológicas acelulares por células endoteliales microvasculares autólogas aisladas, cosechadas en una pequeña biopsia de la vejiga o en la piel e inducidas por células estromales de vejiga, células progenitoras estromales de médula ósea o una mezcla de células uroteliales de vejiga y células estromales de vejiga, representa una exitosa posibilidad de tratamiento de deficiencias de la vías urinarias inferiores.

Sin embargo, estos conocimientos no se limitan a las vías urinarias inferiores, especialmente a la vejiga de la orina, sino que pueden transferirse también a otros órganos, especialmente órganos de partes blandas.

A continuación se explica la invención con más detalle ayudándose de ejemplos y haciendo referencia a los dibujos. Muestran:

La figura 1, un diagrama de columnas que muestra la concentración de VEGF en medios acondicionados y no acondicionados;

La figura 2, un diagrama de columnas que muestra la población celular de células endoteliales microvasculares después de su cultivo con medios acondicionados diferentes dentro de la membrana;

La figura 3, un diagrama de columnas que muestra la longitud de estructuras microvasculares en constructos de trasplante tisular cuyas células endoteliales microvasculares se habían cultivado con medios de cultivo diferentes;

La figura 4A, una fotografía histológica para caracterizar un cultivo *in vivo* de células endoteliales de vejiga microvasculares sembradas sobre la superficie de una matriz acelular bajo inducción estromal o urotelial-estromal en el día 14, en donde las células endoteliales de vejiga se han desprendido de la superficie de la matriz bajo inducción por medio de factores estromales o solubles por vía urotelial-estromal y han penetrado en el armazón de la matriz. En primer lugar, se forma un cordón que está revestido de células. Paulatinamente, se puede reconocer un lumen completamente formado (flechas);

La figura 4B, una fotografía histológica para caracterizar un cultivo *in vitro* de células endoteliales de vejiga microvasculares sembradas sobre la superficie de una matriz acelular bajo inducción estromal o urotelial-estromal en el

día 14, las cuales han formado bajo inducción un tubito en el interior del armazón;

La figura 4C, una fotografía histológica para caracterizar un cultivo *in vitro* de células endoteliales de vejiga microvasculares sembradas sobre la superficie de una matriz acelular bajo inducción con un medio acondicionado por vía estromal o por vía urotelial-estromal en el día 21, pudiendo apreciarse nuevas ramificaciones (flechas) del tubito con el lumen completamente formado, que está revestido con células endoteliales de vejiga microvasculares; y

La figura 4D, una fotografía inmunohistoquímica para caracterizar un cultivo *in vitro* de células microvasculares sembradas sobre la superficie de una matriz acelular bajo inducción con un medio acondicionado por vía estromal o por vía urotelial-estromal en el día 28, estando revestida la estructural luminal por las células endoteliales de vejiga y pudiendo apreciarse una expresión positiva del marcador endotelial del factor de von Willebrand. La capa múltiple de células endoteliales de vejiga microvasculares sembradas sobre la superficie de la matriz expresó también los anticuerpos citados como positivos.

Ejemplos

Los ejemplos siguientes ilustran el procedimiento según la invención para fabricar constructos de trasplante tisular destinados a órganos urinarios inferiores.

Siempre que no se indique por separado, las abreviaturas empleadas tienen el significado siguiente:

b-FGF factor de crecimiento de b-fibroblastos
 DMEM medio de Eagle modificado con Dulbecco
 UEA-1 lectina aglutinina 1 de Ulex Europeaus

Materiales y procedimientos:

(a) Fabricación de matrices acelulares

Vejigas de orina humanas o porcinas y submucosas de vejiga de orina, uretras, dermis e intestinos delgados se lavaron con solución de sal común tamponada con fosfato (PBA) (Invitrogen, Alemania) y se sometieron a un tratamiento con Triton X al 1% durante 24 a 48 horas, a 37°C, bajo cuidadosa agitación. Se verificó histológicamente la acelularidad de las matrices.

(b) Aislamiento, cultivo y caracterización de células endoteliales de vejiga microvasculares humanas y células endoteliales microvasculares dermales

Para aislar células endoteliales de vejiga microvasculares se obtuvo tejido de vejiga humana de cuatro pacientes que se sometieron a una operación de vejiga abierta. Se microdisecionó el urotelio y se trituró el tejido estromal hasta la escisión enzimática y se le digirió con 1 mg/ml de colagenasa tipo II (Worthington Biochemical Corporation, USA)/dispasa (0,05 mg/ml) (Invitrogen)/16 µg/ml de desoxirribonucleasa tipo I (Boehringer Mannheim GmbH, Alemania) en un medio DMEM, que contenía 0,2% de albúmina de suero (Sigma Aldrich, Alemania), durante 2 horas a 37°C y bajo agitación continua. Se centrifugó el material digerido a 2000 rpm y se acumuló la suspensión celular, se la diluyó en el medio DMEM y se la filtró por medio de un aparato de filtración celular con un tamiz de nylon de 40 µm (BD Labware, Alemania). Se diluyó el material filtrado en un medio DMEM (Invitrogen, Alemania) que contenía 2,5% de suero humano. Se acoplaron partículas de poliestireno paramagnéticas (Dynabeads - dinaperlas) (Dyna, Alemania) con lectina UEA-1 (Sigma Aldrich, Alemania) o con un anticuerpo monoclonal para la molécula de adhesión plaqueta sanguínea-célula endotelial 1 (PECAM 1; CD 31) (Dakocytomation, Dinamarca) por incubación de 10⁷ dinaperlas con la lectina o el anticuerpo CD 31, durante 24 horas a temperatura ambiente, bajo rotación con volteo, según las instrucciones del fabricante. Se recogieron las dinaperlas empleando un dispositivo de concentración de partículas magnéticas y se las lavó tres veces en PBS/0,1% de albúmina de suero. Se contaron las células endoteliales de vejiga microvasculares y se las incubó a 4°C, durante 10 minutos, con las dinaperlas revestidas con UEA 1 o con CD 31, bajo rotación con volteo. A continuación, se retiraron de la población de células mixtas las células seleccionadas como positivas empleando un dispositivo para concentrar las partículas magnéticas (relación dinaperlas-células endoteliales 10 : 1). Se recuperaron las células (células endoteliales) adicionadas a las dinaperlas y se las lavó 10 veces en DMEM/2,5% de suero humano. Se lavaron en PBS las células (células estromales de vejiga) no adicionadas seleccionadas como negativas y se las cultivó en frascos de cultivo en las condiciones citadas en (c). Se suspendieron las células endoteliales depuradas en un medio de cultivo, sembrándose 10⁴ células/cm² en cubetas de cultivo. Se cambió el medio cada 2 a 3 días. Se sometieron las células a varias pasadas con un 70% de confluencia de las mismas. Después de la segunda pasada se depuraron nuevamente las células con dinaperlas acopladas por lectina UEA-1 o CD 31. Se confirmó el fenotipo endotelial de las células por tinción inmunohistoquímica empleando el factor de von Willebrand y el anticuerpo CD 34 (ambos de Dako). Se pudieron separar las células también empleando dinaperlas a las que estaba acoplado el CD105 o el CD31) (Miltenyi, Alemania).

Las células endoteliales de vejiga microvasculares así obtenidas de las pasadas tercera a quinta se almacenaron en nitrógeno líquido y se emplearon para los experimentos.

Para aislar células endoteliales microvasculares dermales humanas se lavó varios veces con PBS prepucio humano de pacientes que se habían sometido a una circuncisión. Se separó mecánicamente la dermis de grasa subcutánea por medio de microtijeras. Se incubó el tejido durante 2 horas en 0,25% de dispasa (Boehringer Mannheim, Alemania) para separar la dermis de la epidermis. Se trituró después la dermis y se la incubó durante 30 minutos en tripsina (0,05%)/EDTA (0,01%) (Invitrogen, Alemania). Se filtró y centrifugó la suspensión celular digerida a través de un tamiz de nylon (40 μm de tamaño de poros). Se diluyeron las píldoras celulares en EGM-2 (Cambrex, Alemania) hasta la subconfluencia. A continuación, se retiraron las células de las cubetas de cultivo y se seleccionaron como positivas las células endoteliales microvasculares dermales empleando dinaperlas a las que estaba acoplado el CD-31. Se sometieron las células de la tercera pasada a un segundo procedimiento de separación. Se confirmó el fenotipo endotelial de las células por tinción inmunohistoquímica para el factor de von Willebrand y el CD34. Se almacenaron las células de las pasadas tercera a quinta en nitrógeno líquido y se las empleó para otros experimentos.

(c) Aislamiento y cultivo de células estromales de vejiga y células progenitoras estromales de médula ósea adultas humanas

Las restantes células estromales de vejiga (seleccionadas como negativa), que no se habían acoplado a las dinaperlas, se lavaron en PBS y a continuación se cultivaron en DMEM (Invitrogen, Alemania) con suero adicional y penicilina-estreptomina. Se dictaminó la caracterización inmunohistoquímica con anticuerpos contra α -actina de músculo liso, vimentina y pancitoqueratina.

Se recogieron por aspiración con aguja células progenitoras estromales de médula ósea a partir del material de médula ósea obtenida en el hueso de la cresta iliaca de seis pacientes adultos sanos, y se recogieron estas células en un tubito de ensayo heparinizado de 50 ml. Se mezcló material aspirado con un volumen idéntico de DMEM/10% de suero. Se estratificó la suspensión celular sobre el lado superior de 10 ml de Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech AB, Suecia) y se la centrifugó a 400 g durante 35 minutos a 4°C. Se recogieron de la interfase células mononucleares, se filtraron éstas por medio de un dispositivo de filtración celular con un tamiz de nylon de 100 μm (Becton Dickinson, Alemania) y se las resuspendió en DMEM, complementado con suero humano y penicilina/estreptomina, a una concentración de 10^5 células/cm². Las células se caracterizaron mediante citometría de flujo. A este fin, se tripsinaron células progenitoras estromales de médula ósea, se lavaron éstas con PBS y se las incubó con anticuerpos contra CD34, CD45, CD44, CD73, CD90 (todos de Becton Dickinson) y CD133 (Miltenyi Biotech, Alemania). El análisis se realizó con un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson). Se expandieron las células hasta la confluencia de las mismas, cambiándose el medio de cultivo cada 3 a 4 días.

Las células estromales de vejiga y las células progenitoras estromales de médula ósea de las cinco primeras pasadas se almacenaron en nitrógeno líquido y se emplearon para los experimentos.

(d) Aislamiento y cultivo de células uroteliales y células uroteliales-estromales de vejiga

Para cultivar células uroteliales de vejiga se cortó en pequeños trozos mucosa de vejiga que se había obtenido por microdissección de biopsias de vejiga, se digirieron estos trozos en colagenasa tipo II 1 mg/ml durante 2 horas, se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos y se cultivaron en cubetas de cultivo de 25 ml con suero exento de queratinocitos (Cambrex).

Para obtener una mezcla de células uroteliales de vejiga y células estromales de vejiga se cortaron en trozos pequeños biopsias de vejiga que consistían en urotelio de vejiga y estroma de vejiga y se digirieron y se recogieron dichos trozos como se ha descrito anteriormente. Las células de las cinco primeras pasadas se almacenaron en nitrógeno líquido y se emplearon para los demás ensayos.

(e) Preparación de medios que se acondicionaron con células estromales de vejiga, células progenitoras estromales de médula ósea, células uroteliales y células uroteliales-estromales de vejiga

Se multiplicaron, cada vez independientemente unas de otras, células estromales de vejiga, células progenitoras estromales de médula ósea, células uroteliales y células uroteliales-estromales de vejiga hasta la confluencia de las mismas antes de que se modificara durante 72 h el medio en 20 ml de DMEM, complementado con suero y antibióticos. Los medios acondicionados se sometieron a una infiltración estéril. Se añadió un suplemento de 20 ng/ml de b-FGF a cada medio acondicionado. A continuación, se dividieron los medios en partes alícuotas y se almacenaron a -80°C.

Se empleó un test ELISA para determinar la concentración del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en los medios acondicionados. Para medir la concentración de citocina se desarrolló un ELISA cuantitativo empleando kits comerciales para el factor de crecimiento vasculoendotelial (sistemas R&D). Para estos tests se recogieron los medios acondicionados después de 72 horas de cultivo, se centrifugaron éstos a 2000 rpm durante 10 minutos y se les condujo a través de un filtro de 0,3 μm . Todos los ensayos se realizaron tres veces en placas de microvaloración.

(f) Cultivo de células endoteliales de vejiga microvasculares y células endoteliales microvasculares dermales sobre armazones biológicos

Células endoteliales de vejiga microvasculares o células endoteliales microvasculares dermales obtenidas según (a) fueron cultivadas en cubetas de cultivo con tripsina/EDTA y extraídas al alcanzar un 70% de confluencia, y también fueron contadas y centrifugadas, para obtener píldoras con el número deseado de células. Las células se resuspendieron en un medio de cultivo y se distribuyeron homogéneamente sobre la superficie superior de las matrices a una concentración final de $10^4/\text{cm}^2$. El cultivo celular se realizó durante 28 días a 37°C. Se cultivaron las células con

(a) DMEM complementado con suero y b-FGF (grupo de control a); o

(b) un medio acondicionado con estroma de vejiga, complementado con b-FGF (grupo de cultivo b); o

(c) un medio acondicionado con células precursoras estromales de médula ósea, complementado con b-FGF (grupo de cultivo c); o

(d) un medio acondicionado con urotelio, complementado con b-FGF (grupo de control d); o

(e) un medio acondicionado con urotelio-estroma de vejiga, complementado con b-FGF (grupo de cultivo e).

Todos los experimentos se realizaron al menos por duplicado y se repitieron tres veces independientemente uno de otro.

(g) Análisis microscópico de células endoteliales de vejiga microvasculares o células endoteliales microvasculares dermales cultivadas sobre los armazones biológicos

Al final de cada experimento se deshidrataron armazones biológicos fijados en formalina con concentraciones sucesivamente crecientes de alcohol, se incrustaron éstos en parafina y se les cortó en tramos de 6 mm de anchura. Se analizó la composición de los constructos por medio de hematoxilina-eosina (HE) e inmunohistoquímica empleando factor de von Willebrand antihumano, lectina específica de células endoteliales UEA-1, CD34 antihumano y CD31 antihumano (PECAM-1) y se valoró dicha composición empleando un microscópico de contraste de fases (Zeiss, Alemania). Se valoró la proliferación celular con el marcador de proliferación K167. Existen tres parámetros que pueden emplearse para dictaminar sobre la angiogénesis: longitud de los capilares, número de capilares y rango relativo de los capilares. Nosotros valoramos la longitud de los capilares en tres secciones longitudinales diferentes de cada muestra por medio del ensayo (Watanabe et al., 2005). En este caso, se determinó mediante análisis con microscopio óptico la longitud de los capilares en tres respectivas secciones longitudinales histológicas de tres constructos diferentes de células obtenidas cada una de ellas a partir de una vejiga de orina. A este fin, se cuantificó la longitud de estructuras capilares/tubulares en tramos histológicos dentro de la matriz por medio de una medición manual de los tubitos. Se cuantificaron de la misma manera las densidades celulares de tramos histológicos representativos.

Resultados

Aislamiento y cultivo de células endoteliales microvasculares de vejiga humanas y células endoteliales microvasculares dermales humanas

En primer lugar, se tuvo que desarrollar un procedimiento de selección para aislar y producir cultivos primarios de células endoteliales de vejiga microvasculares a partir de tejido estromal de vejiga, que consta, en primer lugar, de células de músculo liso, fibroblastos y células endoteliales (véase el párrafo anterior (a)). Se emplearon para ello partículas de dinaperlas revestidas con lectina o revestidas con anticuerpos. Se comprobó que era necesaria una limpieza adicional de las dinaperlas durante las primeras cinco pasadas para obtener una cantidad >95% de cultivos puros de células endoteliales de vejiga microvasculares. Las dinaperlas adicionales se lavaron y separaron dentro de las dos primeras pasadas y no interfirieron con el crecimiento o la supervivencia de las células endoteliales microvasculares. La separación de las células endoteliales microvasculares dermales dio como resultado un cultivo que contenía 80% de células endoteliales microvasculares. Una segunda separación de la tercera pasada dio como resultado una pureza de más del 90%. La morfología de las células endoteliales microvasculares primarias de la primera pasada mostró algo de variabilidad en el tamaño y la forma. Al aumentar el número de pasadas, la población celular mostró una morfología homóloga. Las células endoteliales de vejiga microvasculares humanas cultivadas mostraron los rasgos característicos de células endoteliales. Expresaban el antígeno referido al factor VIII y el CD 34.

Aislamiento, cultivo y caracterización de células estromales de vejiga, células progenitoras estromales de médula ósea y células uroteliales-estromales de vejiga

Se produjeron con éxito cultivos primarios de células estromales de vejiga y células progenitoras estromales de médula ósea a partir de estroma de vejiga y médula ósea aspirada. Un cultivo mixto de células uroteliales de vejiga y

células estromales de vejiga resultó también exitoso y contenía células uroteliales, células de músculo liso y fibroblastos. Se obtuvieron satisfactoriamente células uroteliales puras a partir de mucosa de vejiga de orina. Las células aisladas comenzaron a adherirse y crecieron durante los 2 primeros días. Se mantuvieron inactivas durante 3 a 5 días; comenzaron después a multiplicarse rápidamente. Los cultivos de células estromales de vejiga mostraron una morfología unitaria con células de forma de huso. En el cultivo primario (P^0) las células progenitoras estromales de médula ósea mostraron algo de variabilidad en su tamaño y su forma, constando de tres morfologías diferentes. Después de la primera pasada, estas células mostraron una morfología homogénea de forma de huso. Las células estromales de vejiga y las células precursoras estromales de médula ósea mostraron potenciales proliferativos y modelos de crecimiento similares entre ellos. En ambos cultivos se obtuvo la confluencia después de aproximadamente 10 días. En las últimas pasadas ($>P^5$), las células de forma de huso comenzaron a mostrar una morfología plana extendida. Por este motivo, se cosecharon los medios acondicionados solamente en células de las pasadas 1 a 5 (P^1 a P^5).

Las células uroteliales cultivadas mostraron su morfología epitelial típica, que era unitaria bajo acondicionamiento exento de suero. El cultivo mixto de células uroteliales y células estromales de vejiga mostró al mismo tiempo células con fenotipo urotelial y fenotipo estromal de forma de huso. Los cultivos de células uroteliales y los cultivos de células uroteliales-estromales de vejiga fueron sometidos a varias pasadas bajo subconfluencia. Se utilizaron aquí también las células de las cinco primeras pasadas para producir los medios acondicionados.

Se ensayaron las células progenitoras estromales de médula ósea con citometría de flujo para determinar la presencia o la ausencia de marcadores hematopoyéticos característicos. Estas células expresaron típicamente los antígenos CD105 y CD73. Además, las células expresaron CD90 y CD44. Eran negativas para marcadores linfocíticos típicos CD45 y para los marcadores hematopoyéticos tempranos CD34 y CD133.

Los análisis inmunohistoquímicos de células estromales de vejiga mostraron que estas células constaban de dos poblaciones celulares con aproximadamente 50 a 60% de células que muestran expresión positiva para α -actina de músculo liso, y 40 a 50% de células positivas para vimentina sin expresión de α -actina de músculo liso. Los cultivos de células uroteliales formaban una población celular que expresaba exclusivamente pancitoqueratina. El cultivo mixto de urotelio-estroma de vejiga constaba al mismo tiempo de tres poblaciones celulares, a saber, células positivas para pancitoqueratina, células positivas para α -actina de músculo liso y células positivas para vimentina. Los últimos dos tipos de células no se tiñeron con anticuerpos de pancitoqueratina.

Test ELISA

Los medios que se obtuvieron a partir de las células estromales de vejiga cultivadas, las células progenitoras estromales de médula ósea cultivadas, las células uroteliales cultivadas o una mezcla cultivada de células uroteliales de vejiga y células estromales de vejiga mostraron en el test ELISA concentraciones detectables de VEGF, calculándose la mayor concentración a partir del cultivo mixto de células uroteliales de vejiga y células estromales de vejiga (figura 1).

Análisis microscópico de células endoteliales de vejiga microvasculares cultivadas sobre armazones biológicos

Los estudios microscópicos de células endoteliales microvasculares cultivadas sobre armazones biológicos mostraron la adherencia y la supervivencia de células endoteliales microvasculares sobre los armazones biológicos. Después de 24 h, comenzaron a migrar las células endoteliales microvasculares contenidas en la superficie de la membrana acelular, mientras que conservaban su fenotipo diferenciado (inmunorreactividad positiva con el factor de von Willebrand, CD31 y CD 34 y fijación de UEA-1). Estas células cubrían hasta 45 cm^2 de las superficies de la matriz y alcanzaron la confluencia como capa individual en el espacio de dos semanas, lo que muestra una mayor capacidad de migración en los sistemas acondicionados (grupos de cultivo b, c y e). Adoptaron dos morfologías diferentes con un fenotipo redondo y un fenotipo alargado prolongado en los medios acondicionados (grupos de cultivo b, c y e) y adoptaron la mayoría de las veces una morfología redonda en sistemas no acondicionados (grupo de control a) y en sistemas acondicionados solamente con células uroteliales (grupo de control d). Los cultivos que se cargaron con medios estromales acondicionados (grupos de cultivo b, c y e) mostraron una mayor densidad celular total después de 28 días de cultivo en comparación con armazones de control no acondicionados (grupo de control a). La densidad celular total fue la más alta en los sistemas de cultivo que se habían acondicionado con células uroteliales-estromales de vejiga (grupo de cultivo e). El medio acondicionado solo con células uroteliales (grupo de control d) no mostró un número incrementado de células en comparación con los sistemas no acondicionados. En realidad, en los sistemas de cultivo acondicionados (grupos de cultivo b, c y e) se observó la proliferación de las células endoteliales microvasculares en la matriz hasta 28 días, tal como se demostró por tinción para el marcador de proliferación Ki67, y se incrementó la densidad celular con el tiempo. En comparación con esto, las células endoteliales microvasculares en los sistemas de cultivo no acondicionados y en los medios de cultivo acondicionados solamente con células uroteliales (grupo de cultivo d) siguieron proliferando solamente en los primeros 7 a 14 días, pero murieron lentamente a lo largo de las dos a tres últimas semanas del cultivo. El tiempo de cultivo observado fue de 28 días para todos los grupos.

Entre el medio acondicionado con células estromales de vejiga (grupo de control a) y el medio acondicionado con células progenitoras estromales de médula ósea (grupo de cultivo b) no se detectaron diferencias significativas. En estos dos sistemas de cultivo el número de células endoteliales de vejiga microvasculares fue 2,1 a 2,2 veces más alto que en el grupo de control a (figura 2). El número de células endoteliales microvasculares dermales fue en estos dos sistemas de cultivo (grupos de cultivo b y c) 1,5 a 1,7 veces más alto que en el grupo de control a (figura 2). En los sistemas de cultivo con un medio que se había acondicionado con células uroteliales-estromales de vejiga (grupo de cultivo e), el número de células endoteliales de vejiga microvasculares y de células endoteliales microvasculares dermales se había incrementado hasta 3,2 y 2,9 veces, respectivamente, en cada caso comparado con el grupo de control a (figura 2).

El empleo de medios acondicionados (grupos de cultivo b, c y e) condujo a una penetración de las células endoteliales de vejiga microvasculares en las matrices con una profundidad de penetración de hasta 2,3 mm. En estos sistemas acondicionados se indujeron, además, la formación de cordones (tubitos) (figura 4A) y, después de 10 a 14 días, la formación de redes de capilares. El grado de formación de redes dependía de la duración del cultivo hasta el día 28. En concordancia con la diferenciación a manera de capilares se detectaron células endoteliales de vejiga microvasculares o células endoteliales microvasculares dermales que se reunían para obtener lúmenes capilares completamente formados que estaban revestidos con una monocapa de células endoteliales microvasculares (figuras 4B, 4C y 4D) y que estaban teñidas como positivas para el factor de von Willebrand (figura 4D).

En ausencia de un medio acondicionado (grupo de control a) y en sistemas de cultivo que se habían acondicionado solamente con células uroteliales (grupo de control d), las células endoteliales de vejiga microvasculares y las células endoteliales microvasculares dermales mostraron una penetración mínima en la matriz y formaron solamente unos pocos cordones interrumpidos inmaduros durante el periodo de tiempo de cultivo.

Para valorar la actividad de angiogénesis se determinó la longitud de los capilares en tres respectivas secciones longitudinales histológicas de tres constructos diferentes de células obtenidas cada una de ellas a partir de una vejiga de orina. La valoración cuantitativa de la angiogénesis tridimensional *in vitro* se realizó por medición microscópica de la longitud de los tubitos formados en tres campos visuales. Los valores están representados en la figura 3. La longitud más grande de los capilares mostró células endoteliales microvasculares dermales bajo inducción urotelial-estromal (grupo e).

En estos sistemas de cultivo las células endoteliales de vejiga microvasculares alcanzaron una longitud total de los capilares de 240 μm y las células endoteliales de vejiga microvasculares dermales alcanzaron una longitud total de los capilares de 2100 μm (figura 3).

En presencia de citocinas estromales o citocinas uroteliales-estromales no todas las células endoteliales de vejiga microvasculares o todas las células endoteliales microvasculares dermales parecían ser competentes para la invasión. Las células endoteliales de vejiga microvasculares adicionales remanentes o las células endoteliales microvasculares dermales adicionales remanentes no penetraban en la matriz, sino que migraban solamente sobre la superficie de la matriz y formaban sobre ella multicapas de células; éstas representaban así probablemente una subpoblación de una población celular heterogénea.

Aunque las células uroteliales son una fuente para la producción de VEGF, no se ha podido detectar una acción inductora del medio acondicionado solamente con células uroteliales sobre células endoteliales microvasculares. Este resultado indica que las células uroteliales necesitan el efecto adicional de las células estromales de vejiga para inducir la formación de vasos *in vitro*. El efecto sinérgico de las células uroteliales y las células estromales mostró el más fuerte efecto inductor sobre células endoteliales microvasculares con respecto a la proliferación celular y la formación de tubitos-capilares.

Bibliografía

Alberti C, Tizzani A, Piovano M, Greco A. What's in the pipeline about bladder reconstructive surgery? Some remarks on the state of the art *Int J Artif Organs*. 2004; 27(9): 737 – 43.

Atala A. New methods of bladder augmentation. *BJU Int*. 2000; 85Suppl3: 2434; discussion36.

Blau, H. M., and Banfi, A. The well-tempered vessel. *Nature Med*.2001; 7, 532 – 534.

Berthod F, Germain L, Tremblay N, Auger FA. J Cell Physiol. Extracellular matrix deposition by fibroblasts is necessary to promote capillary-like tube formation in vitro.2006 Feb 1.

Carmeliet, P., and Jam, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature (London)*.2000;407,249-257.

Darland DC, D'Amore PA. TGF beta is required for the formation of capillary-like structures in three-dimensional cocultures of 10T112 and endothelial cells. *Angiogenesis*.2001 4(1):11-20.

- Erdag G, Sheridan RL. Fibroblasts improve performance of cultured composite skin substitutes on athymic mice. *Burns*.2004;30(4):322-8.
- 5 Ferrara, N., and Alitalo, K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nature Med*.1999;5,1359-1 364.
- Gruber R, Kandler B, Holzmann P, Vogele-Kadletz M, Losert U, Fischer MB, Watzek G. Bone marrow stromal cells can provide a local environment that favors migration and formation of tubular structures of endothelial cells. *Tissue Eng*.2005; 11 (5-6):896-903.
- 10 Honorati MC, Neri S, Cattini L, Facchini A. Interleukin-17, a regulator of angiogenic factor release by synovial fibroblasts. *Osteoarthritis artilage*.2005;23; [Epub ahead of print].
- 15 Hudon V, Berthod F, Black AF, Damour O, Germain L, Auger FA. A tissueengineered endothelialized dermis to study the modulation of angiogenic and angiostatic molecules on capillarylike tube formation in vitro. *Br J Dermatol*.2003; 148(6):1094-104.
- Jam RK, Au P, Tam J, Duda DG, Fukumura D. Engineering vascularized tissue. *Nat Biotechnol*.2005;23(7):821 -3.
- 20 Keshet, E., and Ben-Sasson, S. A. Anticancer drug targets: approaching angiogenesis. *J.Clin. Invest*.1 999;1 04, 1497-1501.
- Lazarous DF, Shou M, Stiber JA, Dadhania DM, Thirumurti V, Hodge E, Unger EF. Pharmacodynamics of basic fibroblast growth factor: route of administration determines myocardial and systemic distribution. *Cardiovasc Res*.1997;36(1):78-85.
- 25 Markowicz*, E. Koellensperger, S. Neuss, G.C.M. Steffens and N. Pallua. Enhancing the Vascularization of Three-Dimensional Scaffolds: New strategies in Tissue Regeneration and Tissue Engineering. *Topics in Tissue Engineering*, Volume 2, 2005.
- 30 Mertsching H, Walles T, Hofmann M, Schanz J, Knapp WH. Engineering of a vascularized scaffold for artificial tissue and organ generation. *Biomaterials*. 2005;26(33):661 0-7.
- Mooney DJ, Mikos AG. Growing new organs. *Sci Am*. 1999 Apr;280(4):60-5.
- 35 Omaida C. Velazquez, Ruthanne Snyder, Zhao-Jun Liu, Ronald M. Fairman, and Meenhard Herlyn Fibroblast-dependent differentiation of human microvascular endothelial cells into capillary-like, three-dimensional networks. *The FASEB Journal express article* 10.1096/fj. 01-1011fje. Published online June 7,2002.
- 40 Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*.1992;189(2):824-31.
- Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1995;11:73-91.
- 45 Tang YL, Zhao Q, Zhang YC, Cheng L, Liu M, Shi J, Yang YZ, Pan C, Ge J, Phillips MI. Autologous mesenchymal stem cell transplantation induce VEGF and neovascularization in ischemic myocardium. *Regul Pept*2004;117:3-10.
- Thompson H. G., Truong D. T., Griffith C. K., George S. C. A three-dimensional in vitro model of angiogenesis in the airway mucosa. *Pulm Pharmacol Ther*. 2006, Jan 13.
- 50 Velazquez O. C., Snyder R., Lin Z., Fairman R. M., Herlyn M. Fibroblast-dependent differentiation of human microvascular endothelial cells into capillary-like, three-dimensional networks. *The FASEB Journal* 10.1096;06.2002.
- Watanabe M, Fujioka-Kaneko Y, Kobayashi H, Kiniwa M, Kuwano M, Basaki Y. Involvement of integrin-linked kinase in capillary/tube-like network formation of human vascular endothelial cells. *Biol Proced Online*.2005;7:41-7. Epub 2005 Apr 27.
- 55 Yancopoulos, G. D., Davis, S., Gale, N. W., Rudge, J. S., Wiegand, S. J., Holash, J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature (London)*.2000;407,242-248.
- 60

Explicaciones de las figuras 1 a 3

Figura 1:

- 65 Cuantificación de VEGF en medios acondicionados con células estromales de vejiga humanas cultivadas (b), células progenitoras estromales de médula ósea humanas (c), células uroteliales humanas (d) y células uroteliales-

estromales de vejiga humanas (e) en comparación con medios no acondicionados (a), tal como se valoran por medio de análisis ELISA. Los medios se cosecharon 72 horas después de que las células alcanzaran la confluencia. Cada columna mostraba el valor medio \pm desviación estándar.

5 Figura 2:

10 Población celular relativa de células endoteliales microvasculares de vejiga (A) y dermales (B) cultivadas sobre una matriz acelular cargada con medios de cultivo diferentes: a- medio no acondicionado, b- medio acondicionado con células estromales de vejiga, c- medio acondicionado con células progenitoras estromales de médula ósea, d- medio acondicionado con células uroteliales, e- medio acondicionado con células uroteliales-estromales de vejiga. (Valores medio \pm desviación estándar)

Figura 3:

15 Valores medios del análisis con microscópico óptico de todas las longitudes de las redes de tubitos formados por medio de células endoteliales microvasculares de vejiga de orina (A) y dermales (B), cultivadas sobre matrices acelulares, en el día 28 después de la siembra. Se determinó la longitud total de las redes mediante visualización microscópica de tres secciones longitudinales histológicas, a partir de tres constructos diferentes de las células, obtenidas cada una de ellas a partir de una vejiga de la orina. Se calculó la longitud de los tubitos mediante medición
20 manual. Se cargaron cultivos de células endoteliales microvasculares con: a- medio no acondicionado, b- medio acondicionado con células estromales de vejiga, c- medio acondicionado con células progenitoras estromales de médula ósea, d- medio acondicionado con células uroteliales, e- medio acondicionado con células uroteliales-estromales de vejiga. (Valores medios \pm desviación estándar)

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de fabricación de un constructo de trasplante tisular para reconstruir un órgano humano o animal, en el que el constructo de trasplante tisular consta de una membrana y células células endoteliales microvasculares, comprendiendo los pasos de
- (a) aislar células endoteliales microvasculares dermales o células endoteliales de vejiga microvasculares;
- 10 (b) aplicar las células endoteliales microvasculares sobre una membrana acelular biológicamente compatible;
- (c) cultivar bajo inducción estromal o bajo inducción epitelial-estromal las células endoteliales microvasculares que se han aplicado sobre la membrana acelular biológicamente compatible, para formar en la membrana estructuras microvasculares consistentes en células endoteliales microvasculares.
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el órgano humano o animal se selecciona del grupo que comprende la vejiga de la orina, el uréter y la uretra.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, **caracterizado** porque las células endoteliales microvasculares son células endoteliales microvasculares específicas del órgano.
- 20 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque las células endoteliales microvasculares son células endoteliales microvasculares autólogas.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque la inducción estromal se realiza empleando células estromales de vejiga humanas o animales o células progenitoras estromales de médula ósea humanas o animales.
- 25 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque, una vez concluido el cultivo de las células endoteliales microvasculares que se han aplicado sobre la membrana acelular biológicamente compatible, se aplican sobre la membrana y se cultivan allí, bajo inducción estromal o bajo inducción urotelial-estromal (paso (c)), otras células específicas del tejido.
- 30 7. Constructo de trasplante tisular para reconstruir un órgano humano o animal, que consta de
- 35 (a) una membrana acelular biológicamente compatible; y
- (b) células endoteliales microvasculares que atraviesan la membrana, siendo las células endoteliales microvasculares células endoteliales microvasculares dermales o células endoteliales de vejiga microvasculares;
- 40 en donde están formadas dentro de la membrana unas estructuras microvasculares a base de las células endoteliales microvasculares.
8. Constructo de trasplante tisular según la reivindicación 7, **caracterizado** porque el órgano humano o animal se selecciona del grupo que comprende la vejiga de la orina, el uréter y la uretra.
- 45 9. Constructo de trasplante tisular según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, **caracterizado** porque las células endoteliales microvasculares son células endoteliales microvasculares específicas del órgano.
- 50 10. Constructo de trasplante tisular según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, **caracterizado** porque las células endoteliales microvasculares son células endoteliales microvasculares autólogas.
11. Constructo de trasplante tisular según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, **caracterizado** porque las estructuras microvasculares comprenden lúmenes.
- 55 12. Constructo de trasplante tisular según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, **caracterizado** porque las estructuras microvasculares están reticuladas.
- 60 13. Constructo de trasplante tisular según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, **caracterizado** porque las estructuras microvasculares se han formado *in vitro*.

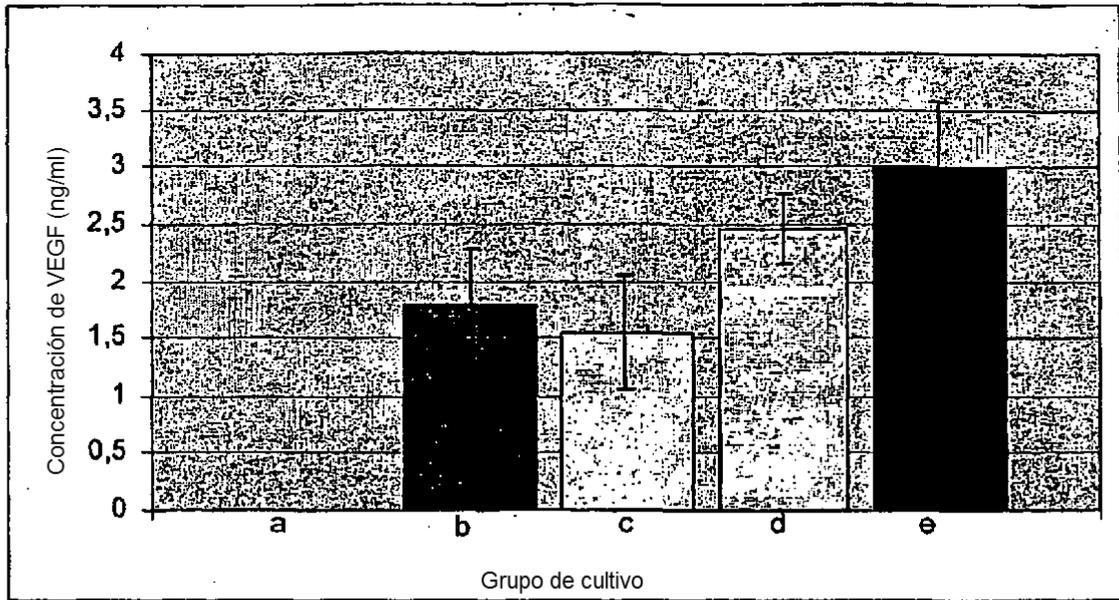
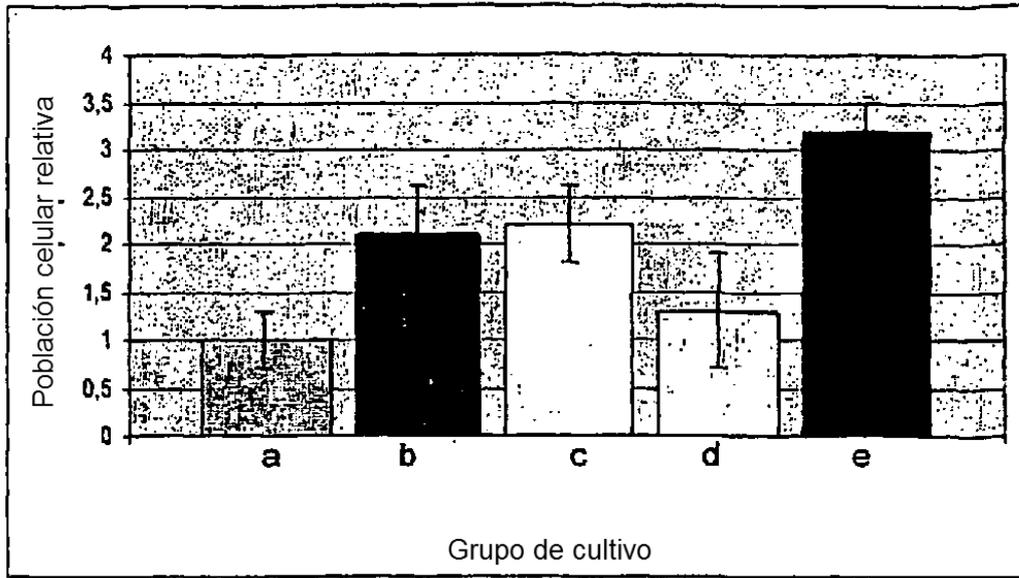
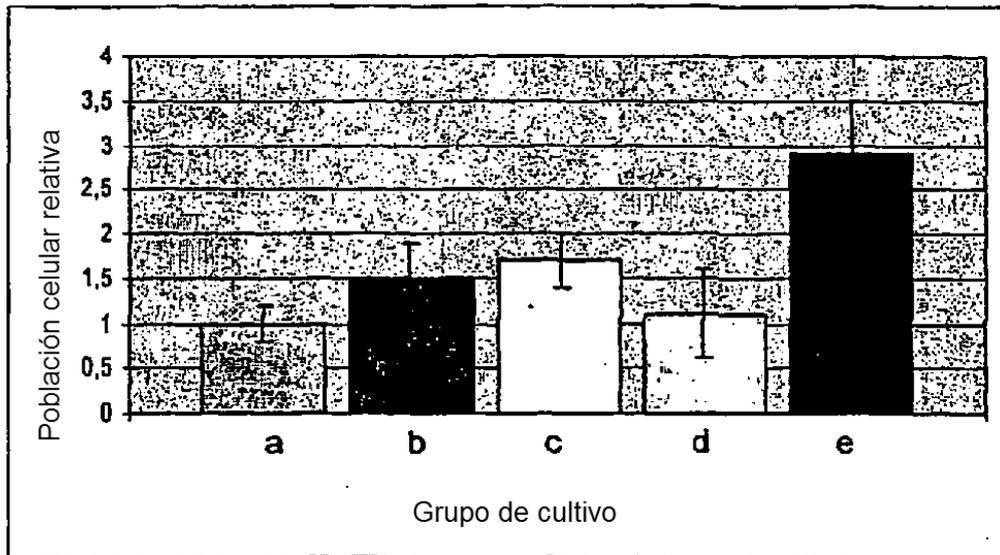


Figura 1



A



B

Figura 2

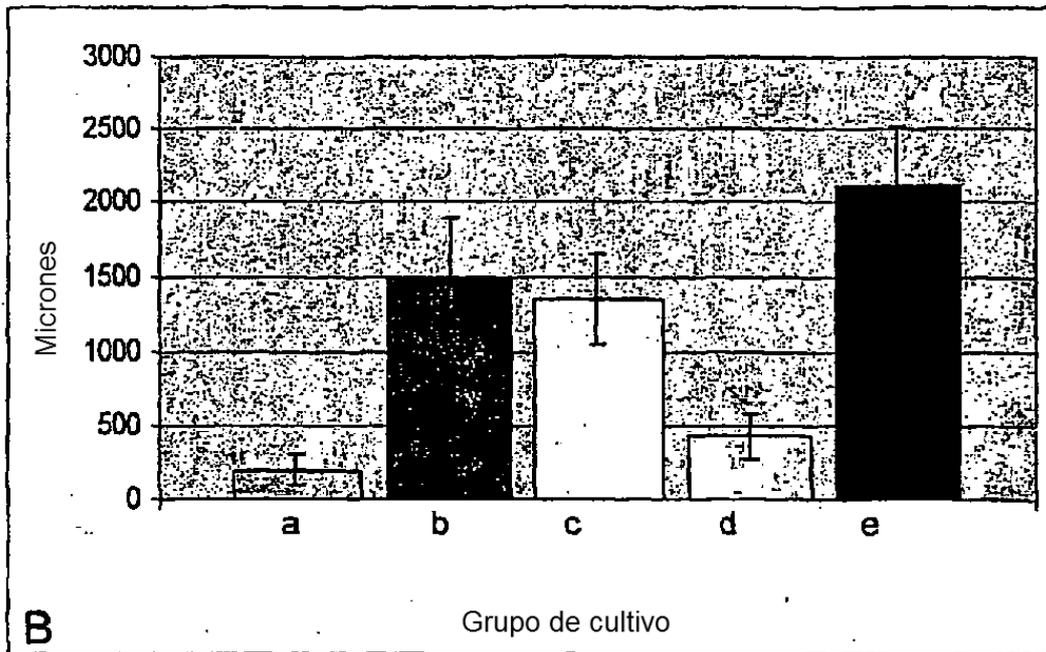
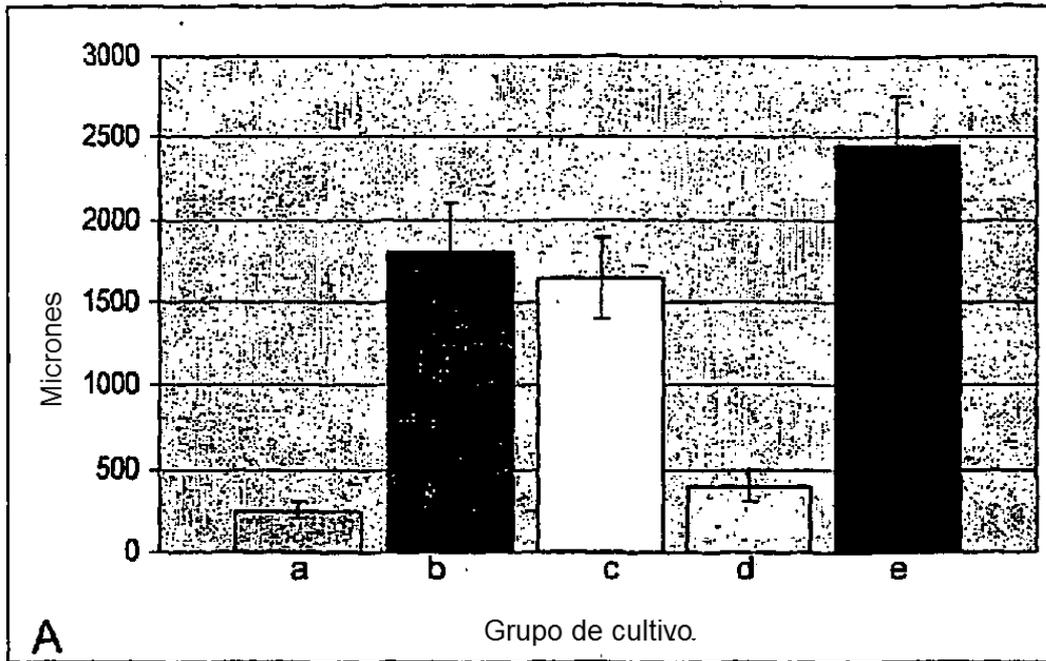


Figura 3

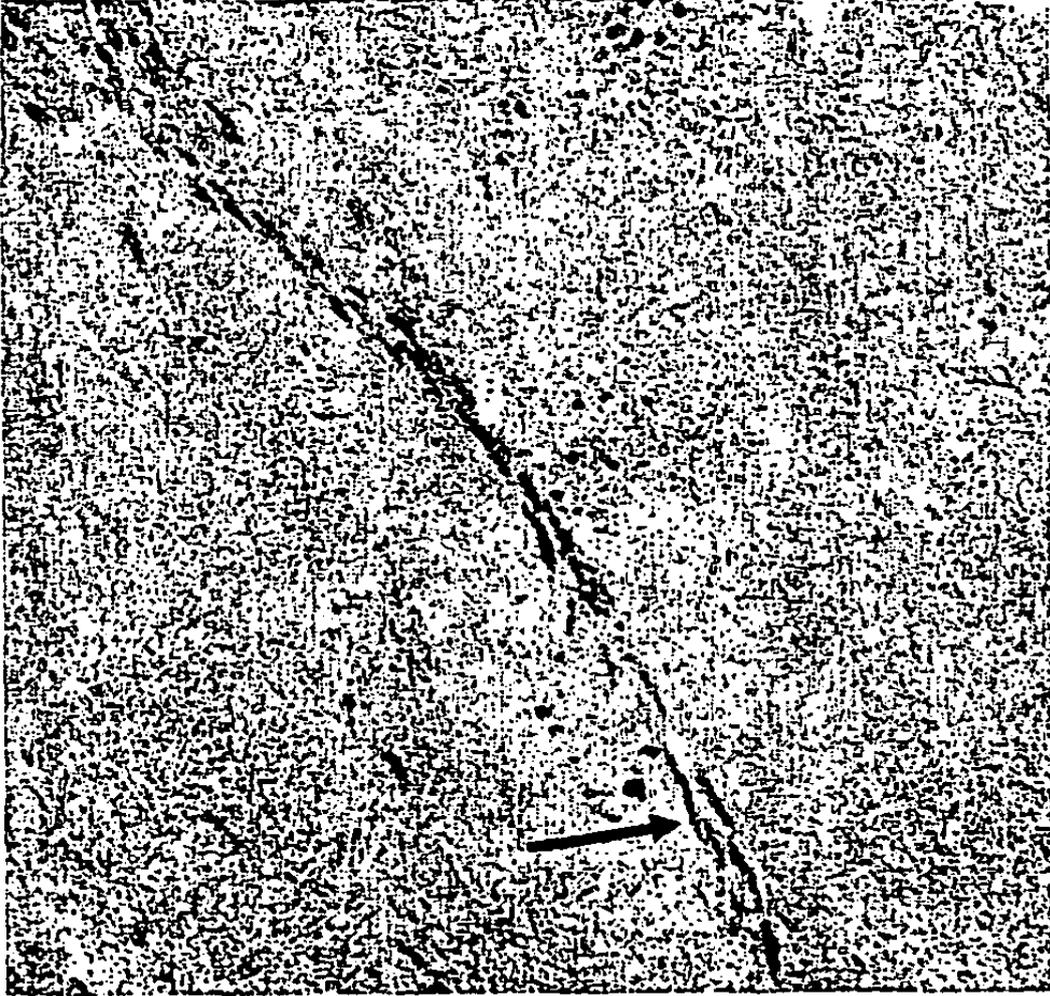


Fig. 4a

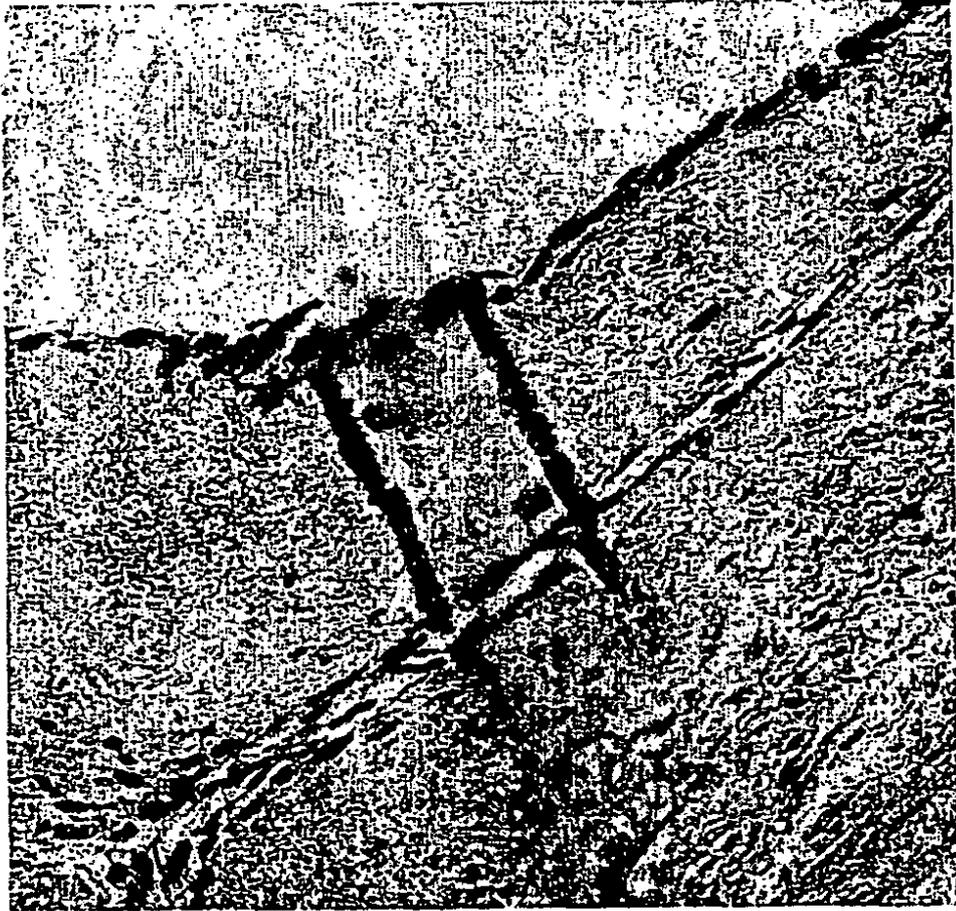


Fig. 4b



Fig. 4c

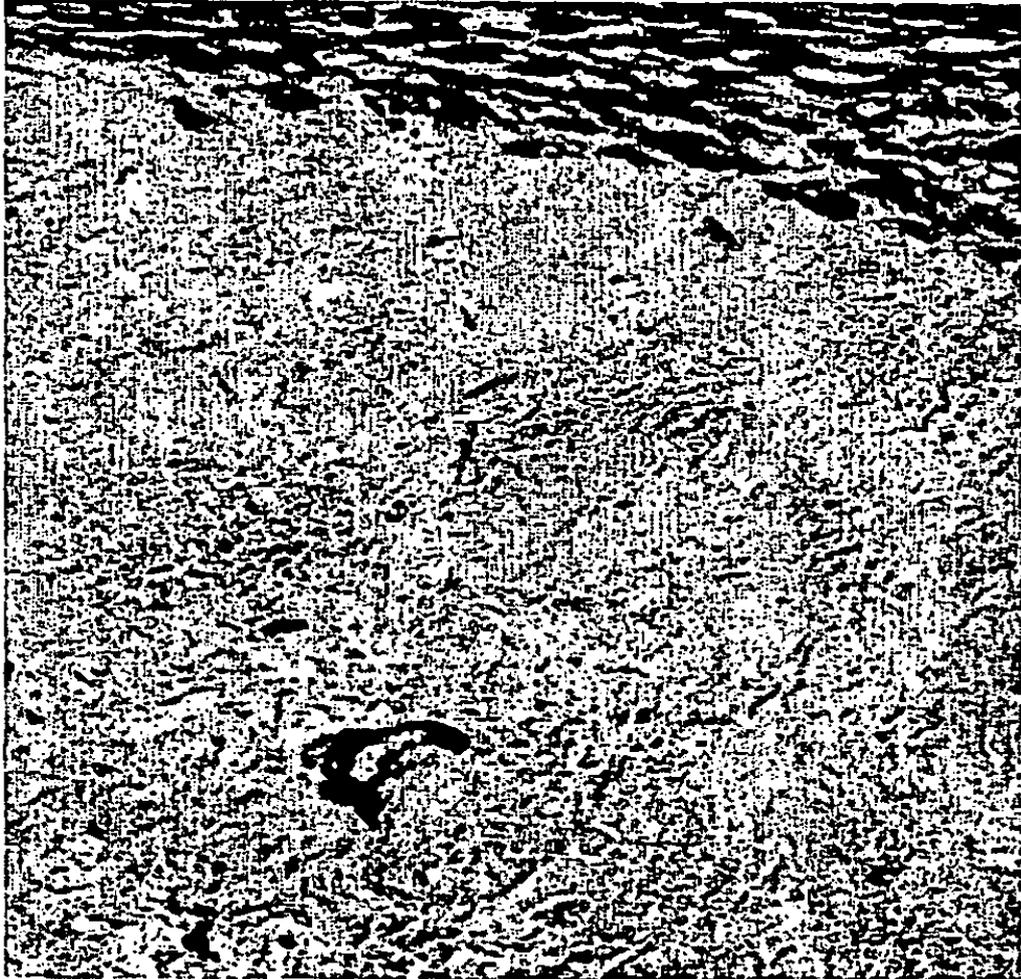


Fig. 4d .