

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 301**

51 Int. Cl.:
C12N 5/071 (2010.01)
C12N 5/07 (2010.01)
A61L 27/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **10181984 .5**
96 Fecha de presentación: **02.07.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **2275532**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.01.2011**

54 Título: **Láminas celulares de tipo miocardio y procesos para producirlas**

30 Prioridad:
21.07.2000 JP 2000221385

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.07.2012

73 Titular/es:
Cellseed Inc.
29-8, Shinjuku 6-chome, Shinjuku-ku
Tokyo 160-0022, JP

72 Inventor/es:
Okano, Teruo;
Shimizu, Tatsuya;
Yamato, Masayuki y
Kikuchi, Akihiko

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

ES 2 385 301 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

Láminas celulares de tipo miocardio y procesos para producirlas.

Campo técnico

5 Esta invención se refiere a láminas celulares de tipo miocardio, y a tejidos de tipo miocardio para su uso en el campo biológico, médico y en otros, así como a procesos para producirlos y a métodos terapéuticos que los utilizan.

Antecedentes de la técnica

10 Con el propósito de construir tejidos miocárdicos *in vitro*, se cultivan células miocárdicas usando soportes tridimensionales hechos de colágeno o ácido poliláctico, y recientemente se han publicado muchos informes sobre esta técnica. Por ejemplo, Eschenhagen y col. informaron sobre la reconstrucción tridimensional en una matriz de colágeno (Eschenhagen y col., *Faseb. J.*, 11, 683-694, 1997). Carrier y col. informaron sobre estructuras que usan soportes tridimensionales hechos de ácido poliláctico (Carrier y col., *Biotechnol. Bioeng.*, 64, 580-589, 1999). Li y col. informaron sobre injertos cardíacos preparados en una malla de gelatina mediante técnicas de bioingeniería (Li y col., *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 119, 368-375, 2000). En cada una de las técnicas de la técnica anterior descritas en estas referencias, las células miocárdicas se cultivan en una matriz tridimensional para que realicen comportamientos de contracción y relajación sobre un sustrato de cultivo. Sin embargo, las masas celulares obtenidas mediante estas técnicas están incrustadas en un gel o una esponja de alto peso molecular, y usarlas para un propósito en particular, digamos, para un propósito médico, implica el problema de contaminación por los materiales altos moleculares. Además, no ha habido técnicas disponibles que permitan que las láminas celulares se coloquen una sobre otra.

20 También se ha informado sobre hallazgos relativos a cultivos celulares de tejidos no miocárdicos tales como la epidermis. Habitualmente, dicho cultivo celular se ha realizado sobre superficies vítreas o en las superficies de polímeros sintéticos sometidos a una variedad de tratamientos. Por ejemplo, en los cultivos celulares se usan ampliamente recipientes que están hechos de poliestireno y a los que se les dan tratamientos superficiales tales como radiación con rayos γ y recubrimientos de silicona. Las células cultivadas y crecidas en estos recipientes son raspadas y recuperadas de su superficie mediante un tratamiento con enzimas proteolíticas tales como tripsina, o con sustancias químicas.

25 La Publicación de Patente Japonesa Nº 23191-1990 describe un método para producir membranas transplantables de tejido queratinoso cultivando queratinocitos en un recipiente de cultivo en unas condiciones en las que se forma una membrana de tejido queratinoso en la superficie del recipiente, y raspando enzimáticamente la membrana de tejido. Específicamente, se desvela una técnica en la que se hacen crecer células 3T3 como capa alimentadora, y se apilan en múltiples capas, y la lámina celular resultante se recupera con una enzima proteolítica dispasa. Sin embargo, el método descrito en la patente ha tenido los siguientes rechazos.

(1) la dispasa es de origen bacteriano, y la lámina celular recuperada debe lavarse meticulosamente.

35 (2) las condiciones del tratamiento con dispasa difieren de una célula cultivada a otra, y el tratamiento requiere pericia.

(3) las células epidérmicas cultivadas son activadas patológicamente mediante un tratamiento con dispasa.

(4) el tratamiento con dispasa descompone la matriz extracelular.

(5) como resultado, la parte enferma en la que se ha injertado la lámina celular recuperada es susceptible de infección.

40 Con estos convenientes, es difícil que el método descrito en la Publicación de Patente Japonesa Nº 23191/2000 se aplique a la construcción *in vitro* de tejidos de tipo miocardio.

45 La Publicación de Patente Japonesa abierta a consulta por el público Nº 192138/1993 describe un método para cultivar células cutáneas preparando un soporte de un cultivo celular con una superficie de sustrato recubierta con un polímero cuya temperatura de disolución crítica inferior o superior en agua es de 0-80°C, cultivar las células cutáneas en el soporte de cultivo celular a una temperatura bien por debajo de la temperatura de disolución crítica superior o bien por encima de la temperatura de disolución crítica inferior, y a continuación desprender las células cutáneas cultivadas llevando la temperatura bien por encima de la temperatura de disolución crítica superior o bien por debajo de la temperatura de disolución crítica inferior. En este método se emplea el cambio de temperatura para desprender las células del sustrato de cultivo recubierto con el polímero termosensible; sin embargo, el método no permite un raspado celular eficiente, y la lámina celular obtenida ha tenido muchos defectos estructurales. Por consiguiente, el método descrito en la Publicación de Patente Japonesa abierta a consulta por el público Nº 192138/1993 también es difícil de aplicar a una construcción *in vitro* de tejidos de tipo miocardio.

Desvelación de la invención

La presente invención se ha realizado en un intento por resolver los anteriormente mencionados problemas de la técnica anterior. Por lo tanto, un objeto de la invención es proporcionar una lámina celular de tipo miocardio hecha de células tisulares miocárdicas que conserven las funciones de contracción y relajación, el acoplamiento eléctrico intercelular y la orientación, así como una estructura tridimensional de la lámina celular. Otro objeto de la invención es proporcionar un método en el que una lámina celular de tipo miocardio cultivada y crecida se pone en contacto íntimo con una membrana polimérica, y se raspa y se recupera de la superficie de un soporte fácilmente, y morfológicamente intacta, sin la necesidad de un tratamiento con una enzima tal como la dispasa, sino cambiando la temperatura ambiental, así como un método para producir estructuras tridimensionales a partir de dichas láminas celulares.

Con objeto de lograr estos objetos, los presentes inventores realizaron esfuerzos de I+D en los que fueron revisados desde varios ángulos. Como resultado, se averiguó que podría construirse una lámina celular con menos defectos estructurales y dotada de diversas capacidades que permitirían que funcionara como un tejido de tipo miocardio *in vitro* mediante un proceso que comprende las etapas de cultivar células tisulares miocárdicas en un soporte de cultivo celular con una superficie de sustrato recubierta con un polímero termosensible, preparando así una lámina celular de tipo miocardio, tratar la lámina para apilar las células de tipo miocardio mediante un método específico, a continuación llevar la temperatura de la disolución de cultivo bien por encima del punto de disolución crítica superior o bien por debajo del punto de disolución crítica inferior, poner la lámina de células cultivadas y apiladas en contacto íntimo con una membrana polimérica, y desprender la lámina junto con la membrana polimérica. También se averiguó que la lámina celular podría construirse mediante un método específico para darle una estructura tridimensional. La presente invención se ha realizado sobre la base de estos hallazgos.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una lámina celular cultivada de tipo miocardio hecha de células tisulares miocárdicas que conservan las funciones de contracción y relajación, el acoplamiento eléctrico intercelular y la orientación.

La invención también proporciona una estructura tridimensional de células cultivadas de tipo miocardio que conserva las funciones de contracción y relajación, así como el acoplamiento eléctrico intercelular tridimensional y la orientación, formando dicha estructura cavidades tubulares de células endoteliales vasculares y/o teniendo una capa celular exterior única de tipo epicardio.

La invención proporciona adicionalmente un proceso para producir una lámina celular de tipo miocardio que comprende cultivar las células en un soporte de cultivo celular con una superficie del sustrato recubierta con un polímero termosensible cuya temperatura de disolución crítica superior o inferior en agua es de 0 ~ 80°C, y subsiguientemente:

- (1) llevar la temperatura de la disolución de cultivo por encima de la temperatura de disolución crítica superior o por debajo de la temperatura de disolución crítica inferior, y opcionalmente;
- (2) poner la lámina celular cultivada en contacto íntimo con una membrana polimérica; y
- (3) desprender la membrana celular junto con la membrana polimérica.

La invención proporciona adicionalmente un proceso para producir una estructura tridimensional de células de tipo miocardio, en la que la lámina celular de tipo miocardio en contacto íntimo con la membrana polimérica obtenida mediante el proceso descrito anteriormente se deja adherir de nuevo a un soporte de cultivo celular, a un soporte de cultivo celular recubierto con un polímero termosensible, a una membrana polimérica o a otra lámina celular, a continuación se desprende la membrana polimérica en contacto íntimo, y se repite el mismo procedimiento para formar una estructura tridimensional de células de tipo miocardio.

Además, la presente invención proporciona una lámina celular de tipo miocardio y una estructura tridimensional que se producen mediante los procesos descritos anteriormente.

Adicionalmente según la invención, la anteriormente descrita lámina celular de tipo miocardio o estructura tridimensional de células de tipo miocardio es alojada en el cuerpo vivo para proporcionar un tejido de tipo miocardio en el que hay cavidades tubulares formadas por células endoteliales vasculares endógenas en dicha lámina celular de tipo miocardio o estructura tridimensional de células de tipo miocardio, y/o se permite que las células endoteliales vasculares del tejido que rodea el injerto alojado crezcan hacia dentro y formen cavidades tubulares, formando así vasos sanguíneos.

Además, la presente invención proporciona la anteriormente descrita lámina celular de tipo miocardio o estructura tridimensional de células de tipo miocardio o dicho tejido de tipo miocardio, que son adecuados para su uso en el tratamiento de una enfermedad cardíaca y otras enfermedades relacionadas con los órganos circulatorios o enfermedades relacionadas con los órganos digestivos.

Aún además, la presente invención proporciona un método para tratar una enfermedad cardíaca y otras

enfermedades relacionadas con los órganos circulatorios o enfermedades relacionadas con los órganos digestivos, que usa la lámina celular de tipo miocardio o la estructura tridimensional de células de tipo miocardio o dicho tejido de tipo miocardio descritos anteriormente.

5 Según la presente invención descrita anteriormente, la lámina celular de tipo miocardio puede recuperarse sin contaminación por parte de una tercera sustancia y con un daño mínimo. Superponiendo una pluralidad de dichas láminas de tipo miocardio puede construirse *in vitro* un tejido de tipo miocardio y es comparable a un tejido miocárdico *in vivo* en que tiene las funciones de contracción y relajación, de estimulación eléctrica intercelular y de orientación. La lámina celular de tipo miocardio y la estructura tridimensional que son proporcionadas por la invención no han estado disponibles mediante la técnica anterior, y por lo tanto, la presente invención es
10 considerablemente valiosa.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra en micrografías el crecimiento de células miocárdicas que fueron cultivadas en una placa de cultivo termosensible (injertadas en una cantidad de $2,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) en comparación con el crecimiento en una placa de cultivo comercial no recubierta con un polímero termosensible.

15 La Fig. 2 muestra los gráficos de motilidad de las células miocárdicas que fueron cultivadas en una placa de cultivo termosensible (injertadas en una cantidad de $2,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) en comparación con la motilidad en una placa de cultivo comercial no recubierta con un polímero termosensible.

La Fig. 3 muestra en micrografías el cambio morfológico de una lámina de células miocárdicas que fueron sometidas a un tratamiento a baja temperatura después del cultivo en una placa de cultivo en la que se injertó
20 poli(N-isopropilacrilamida).

La Fig. 4 ilustra la manipulación bidimensional (método de manipulación (1)) para producir una lámina de células miocárdicas.

La Fig. 5 muestra en micrografías los cambios morfológicos que se produjeron en el citoesqueleto (actina F) y en los núcleos celulares (Núcleos) durante el método de manipulación (1).

25 La Fig. 6 muestra los gráficos de motilidad de las células miocárdicas que se corresponden con los tres estados mostrados en la Fig. 5.

La Fig. 7 ilustra un procedimiento (método de manipulación (2)) para producir una estructura tridimensional consistente en dos capas de células de tipo miocardio realizando el método de manipulación (1) dos veces.

30 La Fig. 8 muestra en micrografías secciones transversales de una lámina de células miocárdicas y una estructura tridimensional que fueron producidas mediante los métodos de manipulación (1) y (2), respectivamente.

La Fig. 9 ilustra un procedimiento (método de manipulación (3)) en el que la membrana polimérica usada en el método de manipulación (1) fue sustituida por una malla polimérica, y al desprender la lámina celular miocárdica se le dio la vuelta junto con la malla polimérica y se fijó en una placa de cultivo.

35 La Fig. 10 ilustra un procedimiento (método de manipulación (4)) en el que la malla polimérica fue fijada previamente en una placa de cultivo aparte, a la que subsiguientemente se transfirió una lámina celular miocárdica según el método de manipulación (1).

40 La Fig. 11 muestra en micrografías una superficie de la lámina celular miocárdica producida mediante el método de manipulación (3) (la foto superior) y una sección transversal de la misma lámina celular después de la tinción con H. E. (la foto inferior).

La Fig. 12 muestra en micrografías la lámina celular miocárdica producida mediante el método de manipulación (3) (las fotos superiores), así como muestra en diagramas la motilidad de la misma lámina celular.

45 La Fig. 13 muestra en micrografías secciones transversales de una estructura tridimensional de células de tipo miocardio que fue producida mediante el método de manipulación (3) y teñida con hematoxilina-eosina.

La Fig. 14 es un par de micrografías, la foto superior de la cual es una sección transversal de una estructura tridimensional de células de tipo miocardio cultivadas que fue producida mediante el método de manipulación (3) y teñida con hematoxilina-eosina.

50 La Fig. 15 ilustra un procedimiento (método de manipulación (5)) para producir una estructura tridimensional de dos capas de células de tipo miocardio mediante una mejora del método de manipulación (3).

La Fig. 16 muestra en micrografías una superficie de la estructura tridimensional de células de tipo miocardio

que fue producida mediante el método de manipulación (5) (la foto superior) y una sección transversal de la misma estructura después de la tinción con H. E. (la foto inferior).

La Fig. 17 ilustra la transmisión de un estímulo eléctrico desde una lámina celular de tipo miocardio a otra que estaba en superposición parcial con la primera lámina.

5 La Fig. 18 muestra en diagramas los complejos electrocardiográficos de un corazón de una rata hospedadora y de una estructura celular injertada que se usaron en el Ejemplo 2.

La Fig. 19 es una micrografía que muestra un corte tisular teñido con Azan alrededor de la estructura celular injertada en una rata en el Ejemplo 2.

10 La Fig. 20 es una micrografía que muestra un corte tisular teñido con Factor VIII alrededor de la estructura celular injertada en una rata en el Ejemplo 2.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

15 Las células tisulares miocárdicas que se van a usar en la invención no están limitadas de ningún modo en particular siempre que se obtengan a partir de un corazón vivo y habitualmente haya alrededor de ellas células miocárdicas, células endoteliales vasculares y fibroblastos. Cultivando estas células se puede producir una lámina celular cultivada de tipo miocardio en monocapa a la que se le puede dar una forma tridimensional mediante un método específico, produciendo una estructura tridimensional de células cultivadas de tipo miocardio.

20 La lámina celular cultivada de tipo miocardio y la estructura tridimensional según la invención están exentas de cualquier daño que de otro modo sería causado por el tratamiento con enzimas proteolíticas tales como la tripsina y la tripsina durante el cultivo. Por lo tanto, la lámina celular y la estructura tridimensional que son desprendidas del sustrato pueden recuperarse como masas celulares adecuadamente fuertes que conservan las proteínas intercelulares que mantienen las capacidades características de las células miocárdicas, tales como las funciones de contracción y relajación, el acoplamiento eléctrico intercelular y la orientación. La estructura tridimensional también se presenta con varias disposiciones celulares características que se asemejan a los tejidos vivos, según se ejemplifica mediante la formación de epicardio formado por tejido conectivo y la formación de cavidades tubulares a partir de células endoteliales vasculares. Descrito específicamente, si se usa una enzima habitual tal como tripsina, las estructuras de desmosomas intercelulares y la proteína de célula a sustrato que se asemeja a la lámina basal rara vez se mantienen intactas, y por lo tanto, las células se separan individualmente cuando son desprendidas del sustrato. De entre las enzimas proteolíticas aplicables, se sabe que la tripsina, que destruye prácticamente toda la proteína de célula al sustrato que se asemeja a la lámina basal, es capaz de permitir que las células sean desprendidas del sustrato manteniendo el 10-60% de las estructuras de desmosomas intactas. Sin embargo, la lámina celular obtenida sólo tiene una pequeña resistencia. Por el contrario, las estructuras de desmosomas y la proteína de tipo lámina basal permanecen cada una al menos un 80% en la lámina celular descrita en este documento, y pueden obtenerse las diversas ventajas descritas anteriormente.

35 El polímero termosensible usado para recubrir el sustrato del soporte de cultivo celular tiene una temperatura de disolución crítica superior o inferior en disolución acuosa que está generalmente en el intervalo de 0°C ~ 80°C, preferiblemente de 20°C ~ 50°C. Si la temperatura de disolución crítica superior o inferior supera los 80°C, las células pueden potencialmente morir, y esto no es preferible. Si la temperatura de disolución crítica superior o inferior es menor de 0°C, la tasa de crecimiento celular habitualmente caerá hasta un punto extremo o las células morirán, lo que no es preferible tampoco.

40 El polímero termosensible que se va a usar en la invención puede ser un homopolímero o un copolímero. Algunos ejemplos de polímero se describen en la Publicación de Patente Japonesa abierta a consulta por el público N° 211865/1990. Específicamente, se obtienen mediante homo o copolimerización de los siguientes monómeros. Algunos monómeros útiles incluyen, por ejemplo, compuestos de metacrilamida, derivados de metacrilamida N-(o N,N-di)alquil sustituidos y derivados de éteres de vinilo; en el caso de copolímeros pueden emplearse dos o más cualesquiera de estos monómeros. Además, esos monómeros pueden copolimerizarse con otros monómeros, o un polímero puede injertarse en otro, o pueden copolimerizarse dos polímeros o puede emplearse una mezcla de un polímero y un copolímero. Si se desea, pueden reticularse los polímeros hasta un grado que no deteriore sus propiedades inherentes.

50 El sustrato que va a ser provisto con recubrimientos puede ser de cualquier tipo, incluyendo aquellos que se usan habitualmente en cultivos celulares, según se ejemplifica mediante vidrio, vidrio modificado y compuestos tales como poliestireno y polimetacrilato de metilo, así como sustancias a las que generalmente puede darse forma, por ejemplo, compuestos poliméricos distintos a los enumerados anteriormente, y cerámicas.

55 El método para recubrir el soporte con el polímero termosensible no está limitado en modo alguno, y puede estar de acuerdo con la desvelación de la Publicación de Patente Japonesa abierta a consulta por el público N° 211865/1990. Específicamente, dicho recubrimiento puede realizarse sometiendo el sustrato y el monómero o el polímero mencionado anteriormente a una exposición a haz de electrones (*electron beam*, EB), irradiación con rayos γ , irradiación con rayos UV, tratamiento con plasma, tratamiento con corona y reacción de polimerización orgánica, o

pueden adoptarse otras técnicas tales como adsorción física, conseguidas mediante la aplicación y el moldeado del recubrimiento.

5 En la presente invención, las células miocárdicas son cultivadas en el soporte de cultivo celular (por ejemplo, una placa de cultivo celular) que ha sido preparada según se describió anteriormente. La temperatura del medio no está limitada a ningún valor en particular; si el anteriormente mencionado polímero que forma el recubrimiento de la superficie de sustrato tiene una temperatura de disolución crítica superior, la temperatura del medio puede ser inferior a dicha temperatura de solución crítica superior; si dicho polímero tiene una temperatura de disolución crítica inferior, la temperatura del medio puede ser mayor que dicha temperatura de solución crítica inferior. Por supuesto, el cultivo es inapropiado si está en un intervalo bajo de temperatura en el que las células cultivadas no crecen, o en un intervalo alto de temperatura en el que las células cultivadas mueren. Las condiciones de cultivo distintas a la temperatura pueden ser las adoptadas en las técnicas convencionales y no están limitadas en ningún modo en particular. Por ejemplo, el medio que se va a usar puede ser uno que esté complementado con sueros tales como suero bovino fetal (*fetal calf serum*, FCS); alternativamente puede ser un medio exento de suero o uno que no esté complementado con ningún suero.

15 En el método de la invención, el tiempo de cultivo puede establecerse según el procedimiento mencionado anteriormente en un valor que se adecúe al objeto específico de uso de la lámina celular de tipo miocardio o de la estructura tridimensional. Con objeto de desprender y recuperar la lámina celular de tipo miocardio o la estructura tridimensional cultivadas del material de soporte, la lámina celular o la estructura tridimensional cultivadas bien se mantienen como tales o bien se ponen opcionalmente en contacto íntimo con la membrana polimérica, y la temperatura del material de soporte en el que están adheridas la células se lleva por encima de la temperatura de disolución crítica superior del polímero con el que está recubierto el sustrato del soporte, o por debajo de su temperatura de disolución crítica inferior, mediante lo cual la lámina celular o la estructura tridimensional cultivadas pueden desprenderse del sustrato separada o conjuntamente con la membrana polimérica con la que se han puesto en contacto íntimo. El desprendimiento de la lámina celular de tipo miocardio o de la estructura tridimensional puede realizarse no sólo en la disolución de cultivo usada para cultivar las células miocárdicas, sino también en otras soluciones isotónicas; la disolución adecuada puede elegirse según el objeto específico. Algunos ejemplos de la membrana polimérica que puede opcionalmente usarse para conseguir el contacto íntimo con la lámina celular o la estructura tridimensional incluyen difluoruro de polivinilideno (*polyvinylidene difluoride*, PVDF), polipropileno, polietileno, celulosa y sus derivados, así como quitina, quitosano, colágeno, papeles tales como papel japonés, poliuretano, materiales poliméricos de tipo red o media elástica tales como Spandex, etc. Usando materiales poliméricos de tipo red o media elástica se pueden producir láminas celulares y estructuras tridimensionales con más grados de libertad y unas capacidades adicionales de contracción y relajación. El método de producción de la estructura tridimensional de células miocárdicas según el segundo aspecto de la invención no está limitado a ningún tipo en particular; un método ejemplar es usar la lámina celular cultivada miocárdica en contacto íntimo con la membrana polimérica mencionada anteriormente. Pueden darse los siguientes métodos como ejemplos específicos.

(1) Se deja que la lámina celular en contacto íntimo con la membrana polimérica se adhiera al soporte del cultivo celular, y a continuación se añade medio para desprender la membrana polimérica de la lámina celular; a continuación, se deja que la lámina celular en íntimo contacto con otra membrana polimérica se adhiera a la primera lámina; este proceso se repite para formar una pila de láminas celulares.

40 (2) Se le da la vuelta a la lámina celular en contacto íntimo con la membrana polimérica y se fija en el soporte del cultivo celular de forma que la membrana polimérica entre en contacto con el soporte; se deja que otra lámina celular se adhiera a la primera lámina celular; a continuación se añade medio para desprender la membrana polimérica de la segunda lámina celular, a la que se deja adherir otra lámina celular más; este proceso se repite para formar una pila de láminas celulares.

45 (3) Se deja que dos láminas celulares en íntimo contacto con la membrana polimérica se adhieran entre sí.

Con objeto de desprender y recuperar la lámina celular de tipo miocardio y la estructura tridimensional con alta eficacia, puede golpearse el soporte del cultivo celular o sacudirse suavemente, agitando el medio con una pipeta, y pueden emplearse otros métodos solos o combinados. Además, la lámina celular de tipo miocardio puede lavarse opcionalmente con una disolución isotónica y similares para desprenderla y recuperarla.

50 La lámina celular de tipo miocardio o la estructura tridimensional que han sido desprendidas del sustrato pueden estirarse en una dirección específica para producir una lámina celular o una estructura tridimensional orientada. El método de estiramiento no está limitado en modo alguno, y un ejemplo es el uso de un aparato de tracción tal como Tensilon, o simplemente tirando de la lámina o la estructura con unas pinzas. Al estar orientada, a la lámina celular o a la estructura tridimensional puede darse direccionalidad en su movimiento. Dado que esto permite que la lámina celular o la estructura tridimensional se coloquen sobre un órgano específico asegurando que será conforme con su movimiento, pueden aplicarse en órganos con alta eficacia.

55 La lámina celular de tipo miocardio y la estructura tridimensional producidas mediante los métodos descritos anteriormente no han sido alcanzables mediante los métodos de la técnica anterior. La lámina celular o la estructura tridimensional producidas conservan la lámina basal que han sido cortadas en la técnica anterior, así que no importa

en qué parte del cuerpo vivo se aloje, incluyendo brazos, hombros, piernas y cualesquiera otras partes u órganos no cardíacos, la lámina celular y la estructura tridimensional se adhieren lo suficientemente viablemente al tejido circundante para que palpiten en cualquier sitio en el que se injerten. La probable razón para esto sería como sigue: tan pronto como la lámina celular o la estructura tridimensional alojadas se adhieren viablemente al tejido vivo, comienzan a contraerse y a relajarse para sufrir hipoxia, y con objeto de compensar esto, las células endoteliales vasculares crecen positivamente hacia dentro desde el tejido vivo para formar vasos sanguíneos, mediante lo que no sólo el oxígeno sino también los nutrientes son suministrados adecuadamente a través de la sangre. De este modo, la lámina celular y la estructura tridimensional que han sido alojadas en el cuerpo vivo contribuyen a la formación *in vivo* de un tejido de tipo miocardio. Se sostiene por tanto que tengan mayores promesas en injertos y en otras aplicaciones clínicas. Específicamente, si se injerta la lámina celular, la estructura tridimensional o el tejido de tipo miocardio de la invención en una zona del corazón con una fuerza contráctil debilitada, demostrarán ser unas herramientas eficaces para tratar enfermedades cardíacas tales como infarto de miocardio; alternativamente, pueden aplicarse en los alrededores de los vasos sanguíneos con objeto de mejorar la circulación, probando así que son herramientas útiles en el tratamiento de abscesos graves, rigidez severa de nuca y disfunción de la aorta.

Nótese que el soporte de cultivo celular que se va a emplear en el método de la invención puede usarse de nuevo varias veces.

Ejemplos

En las páginas que siguen se describe con mayor detalle la presente invención con referencia a los ejemplos, que en modo alguno pretenden limitar la invención.

Ejemplo 1

(Materiales y aparatos usados)

1. Célula: se recolectaron y cultivaron células miocárdicas de embrión de pollo primario mediante procedimientos ordinarios (véase Cardiovasc. Res., 41, 641 (1999)).

2. Placa de cultivo: una placa de cultivo termosensible (injertada en una cantidad de 2,0 µg/cm²). Como control se usó una placa de cultivo comercial (Falcon 3001) no recubierta con un polímero termosensible.

3. Medio: se usó un medio consistente en 6% de FBS, 40% de medio 199, 0,2% de penicilina-estreptomicina, glucosa 2,7 mM y 54% de disolución salina fisiológica (NaCl 116 mM, NaH₂PO₄ 1,0 mM, MgSO₄ 8 mM, KCl 1,18 mM, CaCl₂ 0,87 mM y NaHCO₃ 26,2 mM).

4. Cultivo: las células miocárdicas de embrión de pollo primario se colocaron en placas en una placa de cultivo de 35 mm a una densidad celular de 0,5 x 10⁶ células/cm².

5. Las demás condiciones se correspondían con los procedimientos ordinarios.

6. Observación de las células bajo el microscopio: se usaron un microscopio de contraste de fases (ET300 de Nikon) y un microscopio de fluorescencia (DMIRB de Leica).

7. Método para medir los comportamientos de contracción y relajación: las fotografías tomadas con una cámara CCD (RS-170 de COHU) se sometieron a un análisis de imagen.

(Método)

Se empleó el siguiente método específico para preparar las láminas celulares de tipo miocardio.

Se aislaron células miocárdicas de un embrión de pollo de 10 días usando tripsina y se cultivaron en una placa de cultivo termosensible, a saber, una placa de cultivo en la que se había injertado poli(N-isopropilacrilamida) (PIPAAm). Con objeto de reducir la adhesión a las células se usaron mallas de diversos polímeros como soportes y se sometieron a un tratamiento a baja temperatura (20°C). La lámina celular miocárdica que se adhería a la malla se desprendió de la placa de cultivo, sobre la que se le dio la vuelta, y se cultivó en estado libre. La malla que se adhería a la lámina celular miocárdica se apiló sobre otra lámina celular miocárdica que había sido cultivada en una placa de cultivo termosensible; tras un tratamiento a baja temperatura, a las láminas celulares miocárdicas se les dio la vuelta junto con la malla y se cultivaron. La morfología celular se visualiza tomando imágenes de cortes tisulares (teñidos con H. E. y Azan). Las funciones de contracción y relajación de las células cardíacas se cuantificaron usando un analizador de imágenes usando imágenes que fueron registradas con un VTR a través de una cámara CCD conectada a un microscopio. Aunque el método de cuantificación no está limitado a un modo en particular, un ejemplo puede ser tal que haya áreas visibles de baja y alta densidad incluidas en el citoplasma, y se monitorizan sus movimientos con el analizador de imágenes y se determinan sus loci.

(Resultados)

La Fig. 1 muestra en micrografías el crecimiento de células miocárdicas que fueron cultivadas en una placa de cultivo termosensible (injertadas en una cantidad de $2,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) en comparación con el crecimiento en una placa de cultivo comercial no recubierta con un polímero termosensible. En la Fig. 1, Normal se refiere al caso en el que el cultivo estaba efectuado en la placa de cultivo comercial, y PIPAAm se refiere al caso del cultivo en la placa de cultivo termosensible. Escaso indica un crecimiento escaso de las células miocárdicas, y Confluyente indica confluencia de las células miocárdicas. A partir de la Fig. 1 puede observarse que las células miocárdicas eran tan confluyentes en la placa de cultivo injertada con poli(N-isopropilacrilamida) como en la placa de cultivo comercial normal.

La Fig. 2 muestra en diagramas la motilidad de las células miocárdicas cultivadas en la placa de cultivo termosensible (injertadas en una cantidad de $2,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) en comparación con la motilidad en la placa de cultivo comercial no recubierta con polímero termosensible. En la Fig. 2, Normal se refiere al caso en el que el cultivo estaba efectuado en la placa de cultivo comercial, y PIPAAm se refiere al caso del cultivo en la placa de cultivo termosensible. Movimiento muestra el resultado de la medida de la amplitud celular con el analizador de imágenes, que refleja la contracción y la relajación de las células miocárdicas. A partir de la Fig. 2 puede observarse que las células miocárdicas cultivadas en la placa de cultivo injertada con poli(N-isopropilacrilamida) tenían unas funciones de contracción y relajación comparables a las células miocárdicas cultivadas en la placa de cultivo comercial normal. La diferencia es las células miocárdicas cultivadas en la placa de cultivo injertada con poli(N-isopropilacrilamida) variaban en un intervalo menor, dado que estaban adheridas más firmemente a la placa.

La Fig. 3 muestra en micrografías el cambio morfológico de las células miocárdicas que fueron sometidas a un tratamiento a baja temperatura tras el cultivo en la placa de cultivo injertada con poli(N-isopropilacrilamida). En la Fig. 3, Pre muestra la morfología de las células miocárdicas antes del tratamiento a baja temperatura, y Post, tras el tratamiento a baja temperatura. A partir de la Fig. 3 está claro que las células de la placa de cultivo injertada con poli(N-isopropilacrilamida) pudieron desprenderse mediante el tratamiento a baja temperatura.

La Fig. 4 ilustra la manipulación bidimensional para producir una lámina celular miocárdica y este método se denomina en lo sucesivo método de manipulación (1). La primera etapa de este método es cultivar las células miocárdicas en la placa de cultivo injertada con poliisopropilacrilamida. Después de alcanzar la confluencia, las células se sometieron a un tratamiento a baja temperatura en contacto íntimo con una membrana polimérica (difluoruro de polivinilideno), se desprendieron de la placa de cultivo y se transfirieron a otra placa de cultivo. En la Fig. 4, membrana de Soporte se refiere a la membrana polimérica, placa injertada con PIPAAm se refiere a la placa de cultivo injertada con poli(N-isopropilacrilamida), placa de cultivo Normal se refiere a la placa de cultivo comercial normal, y lámina celular cardiaca Recuperada se refiere a la lámina celular miocárdica recuperada.

La Fig. 5 muestra en micrografías los cambios morfológicos que se produjeron en el citoesqueleto (actina F) y en los núcleos celulares (Núcleos) durante el método de manipulación (1). En la Fig. 5, lámina Normal se refiere a las células cultivadas en la placa de cultivo injertada con poli(N-isopropilacrilamida), lámina Contraída se refiere a las células que se enrollaron sobre sí mismas después de desprender la lámina de la placa, y lámina Recuperada se refiere a la lámina celular miocárdica que se dejó adherir de nuevo a un soporte de cultivo celular después de ser recuperada junto con la membrana polimérica. A partir de Fig. 5 está claro que la lámina celular transferida en la placa de cultivo aparte (identificada como lámina Recuperada en la Fig. 5) podría reproducir la morfología de las células antes de la transferencia.

La Fig. 6 muestra en diagramas la motilidad de las células miocárdicas que se corresponde con los tres estados mostrados en la Fig. 5. Movimiento muestra el resultado de la medida de la amplitud celular con el analizador de imágenes, que refleja la contracción y la relajación de las células miocárdicas. La Fig. 6 respalda que las funciones de contracción y relajación de las células miocárdicas se mantuvieron tanto antes como después de realizar el método de manipulación (1) (comparar la lámina Normal con la lámina Recuperada). La lámina celular que no se desprendió junto con la membrana polimérica pudo desprenderse del soporte del cultivo mediante el tratamiento a baja temperatura; sin embargo, la lámina celular se contrajo y se enrolló sobre sí misma, impidiendo a las células mostrar las deseadas funciones de contracción y relajación.

La Fig. 7 ilustra un método para producir una estructura tridimensional consistente en dos capas de células miocárdicas realizando el método de manipulación (1) dos veces, y el método se denomina en lo sucesivo método de manipulación (2). En el método de manipulación (2), la lámina celular en íntimo contacto con la membrana polimérica se deja adherir al soporte de cultivo celular, y a continuación se añade medio para desprender la membrana polimérica de la lámina celular, que se deja adherir a otra lámina celular en contacto íntimo con la membrana polimérica; este proceso se repite para apilar láminas celulares.

En la Fig. 7, membrana de Soporte se refiere a la membrana polimérica, mientras que placa de cultivo injertada con PIPAAm y placa de cultivo Normal tienen los mismos significados a los definidos anteriormente, y láminas celulares cardiacas Apiladas se refiere a las láminas celulares miocárdicas en dos capas.

La Fig. 8 muestra en micrografías secciones transversales de láminas celulares miocárdicas que fueron producidas mediante los métodos de manipulación (1) y (2). Ambos tipos de láminas celulares miocárdicas se tiñeron con hematoxilina-eosina. En la Fig. 8, capa Individual muestra el aspecto en sección transversal de las células

miocárdicas (como capa individual) que fueron producidas mediante el método de manipulación (1) y capas Dobles muestra el aspecto en sección transversal de las células miocárdicas (como capa doble) que fueron producidas mediante el método de manipulación (2). Tinción con Hematoxilina-eosina significa aquellas láminas celulares que fueron teñidas con hematoxilina-eosina.

5 La Fig. 9 ilustra un método en el que la membrana polimérica usada en el método de manipulación (1) fue sustituida por una malla polimérica, y se le dio la vuelta a la lámina celular miocárdica junto con la malla polimérica al ser desprendida, y se fijó en una placa de cultivo, y el método se denomina en lo sucesivo método de manipulación (3). Según el método de manipulación (3), la malla usada como material polimérico en contacto con la lámina celular miocárdica ayudó a incrementar sus funciones de contracción y relajación. En la Fig. 9, Malla se refiere a la malla polimérica, mientras que placa injertada con PIPAAm y placa de cultivo Normal tienen los mismos significados a los
10 definidos anteriormente. Lámina celular cardíaca libre Recuperada se refiere a la lámina celular miocárdica libre recuperada, e Invertir significa dar la vuelta a la lámina celular miocárdica desprendida en la placa de cultivo junto con la malla polimérica.

15 La Fig. 10 ilustra un método en el que la malla polimérica fue fijada previamente sobre una placa de cultivo aparte, a la que subsiguientemente se transfirió una lámina celular miocárdica según el método de manipulación (1) y el método se denomina en lo sucesivo método de manipulación (4). En la Fig. 10, membrana de Soporte, placa injertada con PIPAAm y lámina celular cardíaca libre Recuperada tienen los mismos significados a los definidos anteriormente, y Malla en una placa de cultivo se refiere a la malla fijada en la placa de cultivo.

20 La Fig. 11 muestra en micrografías una superficie de la lámina celular miocárdica producida mediante el método de manipulación (3) (la foto superior) y una sección transversal de la misma lámina celular después de una tinción con H. E. (la foto inferior). En la Fig. 11, Malla tiene el mismo significado de antes, lámina cardíaca Libre se refiere a la lámina celular miocárdica libre, y vista de la sección Transversal (H. E.) muestra una sección transversal de la lámina teñida con H. E..

25 La Fig. 12 muestra en micrografías la lámina celular miocárdica producida mediante el método de manipulación (3) (las fotos superiores), así como muestra en diagramas la motilidad de la misma lámina celular. En la Fig. 12, Movimiento tiene el mismo significado al definido anteriormente, En la placa se refiere a la lámina celular en una placa de cultivo, y En la malla se refiere a la lámina celular en la malla. A partir de la Fig. 12 puede observarse que el soporte en forma de malla contribuía a incrementar los cambios en la motilidad de las células miocárdicas.

30 La Fig. 13 muestra en micrografías secciones transversales de una lámina celular miocárdica cultivada que fue producida mediante el método de manipulación (3) y teñida con hematoxilina-eosina.

35 La Fig. 14 muestra en micrografías secciones transversales del tejido miocárdico en una lámina celular miocárdica cultivada que fue producida mediante el método de manipulación (3) y teñida con hematoxilina-eosina (la foto superior) y un tejido miocárdico de un embrión de pollo en el día 10 (la foto inferior). A partir de la Fig. 14 puede observarse que el tejido miocárdico obtenido mediante el método de la invención tiene una estructura muy similar al tejido *in vivo*.

40 La Fig. 15 ilustra un método de producción de una lámina celular miocárdica en bicapa mediante una mejora del método de manipulación (3) y el método se denomina en lo sucesivo método de manipulación (5). En el método de manipulación (5), se usa una media elástica como malla polimérica. En la Fig. 15, Malla, placa injertada con PIPAAm, Invertir y placa de cultivo Normal tienen los mismos significados a los definidos anteriormente. Láminas celulares cardíacas libres Recuperadas (Doble) se refiere a las láminas celulares miocárdicas libre recuperadas (en dos capas).

45 La Fig. 16 muestra en micrografías una superficie de la lámina celular miocárdica de doble capa que fue producida mediante el método de manipulación (5) (la foto superior) y una sección transversal de la misma lámina después de la tinción con H. E. (la foto inferior). En la Fig. 16, Malla y vista en sección Transversal (H. E.) tienen los mismos significados a los definidos anteriormente. Individual en la foto superior representa la primera capa y Doble, la segunda capa.

50 La Fig. 17 ilustra la transmisión de un estímulo eléctrico desde una lámina celular de tipo miocardio (en el lado derecho de la Figura e indicada por a) a otra lámina celular que estaba en superposición parcial con la primera lámina (en el lado izquierdo de la Figura e indicada por b). Dado que la Fig. 17 es un dibujo alargado horizontalmente, las posiciones verticales relativas se muestran como rotadas en sentido antihorario a través de 90 grados. En la Fig. 17, estimulación Eléctrica significa estímulos eléctricos pulsados enviados desde la lámina celular del lado derecho, y las barras verticales que aparecen en la última mitad (del lado derecho) de la línea que se extiende desde debajo de estimulación Eléctrica representan los estímulos pulsados. Los estímulos aplicados transmitidos a la lámina celular del lado izquierdo se midieron observando la amplitud celular definida anteriormente
55 con un analizador de imágenes (según se indica mediante la observación en la Fig. 17). En la Fig. 17, Movimiento se refiere al resultado de la medida de la amplitud celular con el analizador de imágenes, y latido Espontáneo se refiere al comportamiento de las células a las que se les aplicaron los estímulos eléctricos. Obviamente, los estímulos eléctricos aplicados a una lámina celular incrementaban el ritmo de contracción y relajación de la otra lámina celular.

Esto significa que las láminas celulares de tipo miocardio producidas mediante la presente invención conservan el acoplamiento eléctrico intercelular no sólo dentro de una lámina sino también entre dos láminas superpuestas.

(Discusión)

El Ejemplo 1 y los resultados mostrados en las Figs. 1-17 revelaron lo siguiente.

- 5 (1) La lámina celular miocárdica en la malla y su estructura tridimensional se contraían y se relajaban en mayor grado que cuando estaban fijadas en la superficie interior de una placa de cultivo. Esto podría ser porque las células individuales adquirirían más grados de libertad al ser desprendidas de la placa de cultivo.
- 10 (2) Cuando las láminas celulares miocárdicas se apilaban para producir una estructura tridimensional, se encontró que dos láminas se adherían firmemente entre sí en un corte tisular. Además, las láminas celulares miocárdicas apiladas latían en sincronismo general, sugiriendo el acoplamiento eléctrico entre las dos láminas. Cuando toda la lámina celular miocárdica se contraía en una dirección de la malla, las células miocárdicas se alineaban para formar manojos tridimensionales en una dirección perpendicular a la primera dirección; como resultado, las células miocárdicas se orientaban y latían en la dirección del eje principal.
- 15 (3) Como resultado de un cultivo prolongado (de 5 días), se observó una capa celular individual de tipo epicardio alrededor de los manojos de células miocárdicas en la sección transversal del corte tisular.

Ejemplo 2

Se aislaron células miocárdicas de una rata recién nacida con colagenasa y se colocaron en placas en la misma placa de cultivo termosensible a la usada en el Ejemplo 1. El cultivo se realizó durante 4 días con el mismo medio y en las mismas condiciones que en el Ejemplo 1, y la lámina celular miocárdica confluyente se desprendió mediante un tratamiento a baja temperatura. Se colocaron dos láminas celulares desprendidas de tipo miocardio una sobre la otra pipeteando en la disolución de cultivo. Esto se realizó sin usar una membrana polimérica, y según se contraían las láminas miocárdicas después de ser desprendidas se colocaron inmediatamente en superposición. En aproximadamente 20 minutos, las dos láminas se adhirieron firmemente la una a la otra. La estructura tridimensional obtenida se transplantó en el tejido subcutáneo dorsal de una rata atímica (rata con inmunodeficiencia F344) mediante un método convencional.

Como muestra la Fig. 18, se observó un complejo electrocardiográfico en la superficie corporal de la rata inmediatamente después del trasplante; era independiente del latido del corazón de la rata hospedadora, y se originaba en la estructura celular injertada. Tres semanas después del trasplante se hizo una incisión en el sitio del injerto, y tanto el latido de la estructura celular injertada como la neogénesis de vasos sanguíneos en esa estructura que crecía a partir del tejido vivo fueron reconocidos a simple vista.

La Fig. 19 es una micrografía que muestra un corte tisular teñido con H. E. y Azan alrededor de la estructura celular injertada. La estructura celular injertada era un tejido muscular y se tiñó de rojo, mientras que el tejido subcutáneo en el que estaba injertada era un tejido conectivo y se tiñó de azul. En la estructura celular injertada se reconocen los vasos sanguíneos teñidos de rojo, indicando la presencia de eritrocitos en los vasos. La formación de vasos sanguíneos en la estructura celular injertada también pudo verificarse a partir de la Fig. 20, que es una micrografía que muestra el resultado de una inmunotinción con Factor VIII caracterizada por la tinción selectiva de las células endoteliales vasculares.

A partir de lo anterior está claro que en el corte tisular también se produjo una estructura que se asemeja al tejido miocárdico, y la neogénesis de vasos sanguíneos.

40 **Aplicabilidad industrial**

Según la presente invención, pueden cultivarse láminas celulares miocárdicas tridimensionalmente para construir un tejido de tipo miocardio. Por lo tanto, la invención contiene una gran promesa en aplicaciones clínicas y es extremadamente útil en los campos médico y biológico, particularmente en ingeniería celular e ingeniería médica.

REIVINDICACIONES

1. Una lámina celular cultivada de tipo miocardio hecha de células tisulares miocárdicas que conservan las funciones de contracción y relajación, el acoplamiento eléctrico intercelular y la orientación,
- 5 en la que la lámina celular se puede obtener desprendiendo desde un soporte de cultivo celular con una superficie del sustrato recubierta con un polímero termosensible cuya temperatura de disolución crítica superior o inferior en agua es de 0-80°C sin ser tratada con una enzima proteolítica, y
- en la que la lámina celular se contrae y no tiene contaminación por una tercera sustancia, y
- en la que las células se han obtenido a partir de un corazón.
- 10 2. La lámina celular cultivada de tipo miocardio según la reivindicación 1, que puede obtener una orientación en una dirección específica estirándola en la dirección específica después de ser desprendida del sustrato.
3. Un proceso para producir una lámina celular de tipo miocardio, que comprende cultivar células que se han obtenido a partir de un corazón en un soporte de cultivo celular con una superficie del sustrato recubierta con un polímero termosensible cuya temperatura de disolución crítica superior o inferior en agua es de 0-80°C, y subsiguientemente:
- 15 (1) llevar la temperatura de la disolución de cultivo por encima de la temperatura de disolución crítica superior o por debajo de la temperatura de disolución crítica inferior y
- (2) desprender la lámina celular del soporte de cultivo,
- en el que la lámina celular desprendida del soporte de cultivo se contrae y no tiene contaminación por una tercera sustancia.
- 20 4. El proceso para producir una lámina celular cultivada de tipo miocardio según la reivindicación 3, en el que la etapa de desprendimiento no implica el tratamiento con una enzima proteolítica.
5. El proceso para producir una lámina celular de tipo miocardio según la reivindicación 3, en el que el polímero termosensible es poli(N-isopropilacrilamida).
- 25 6. El proceso para producir una lámina celular de tipo miocardio según la reivindicación 3, en el que la lámina celular se desprende del soporte de cultivo junto con una membrana polimérica elegida del grupo formado por una membrana de difluoruro de polivinilideno hidrofílica, poliuretano, una malla de Spandex y un material de tipo malla elástica.
- 30 7. La lámina celular de tipo miocardio según la reivindicación 1 ó 2, para su uso en un método de tratamiento de enfermedades cardíacas y otras enfermedades relacionadas con los órganos circulatorios o de enfermedades relacionadas con los órganos digestivos.

Fig. 1

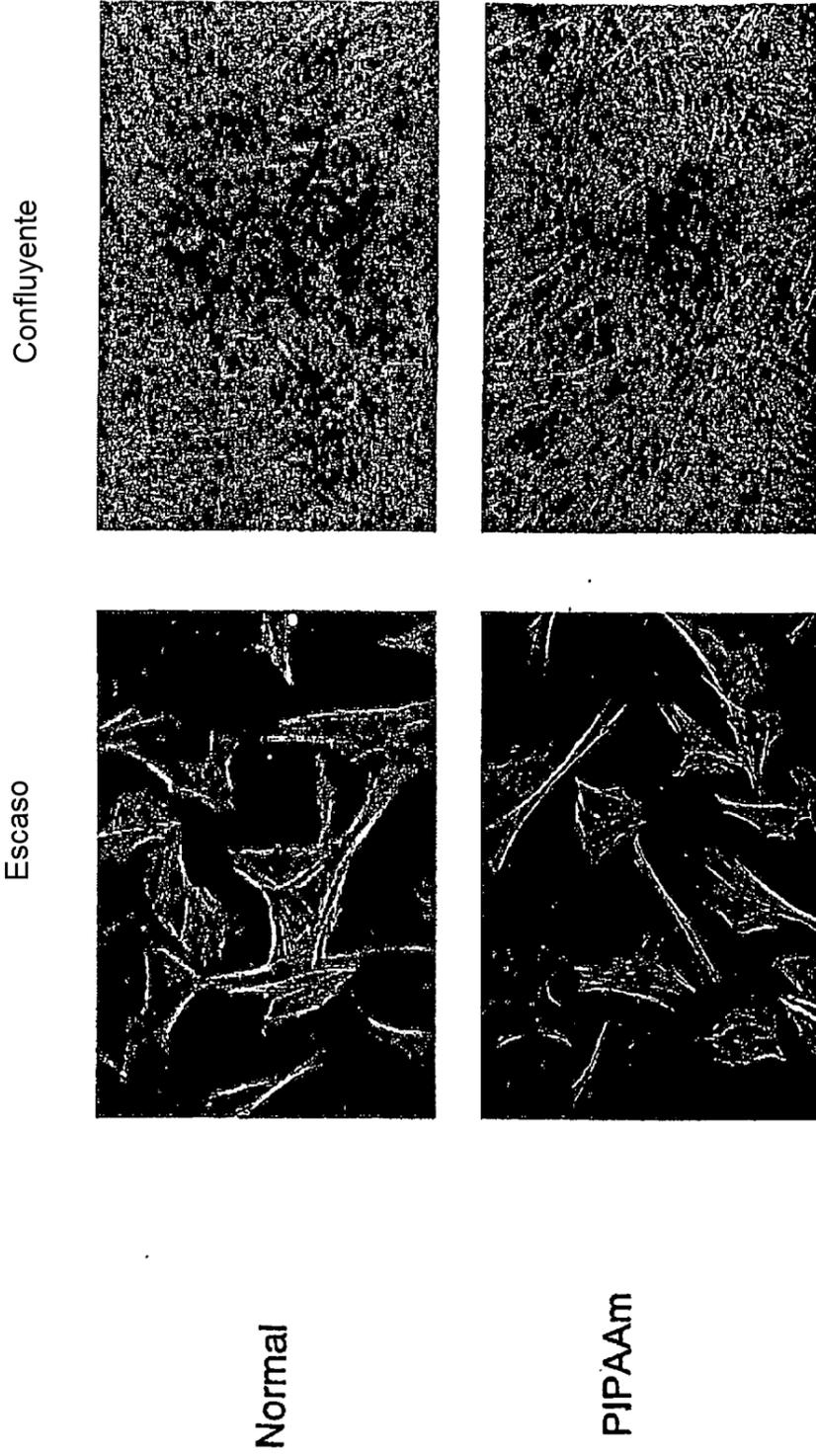


Fig. 2

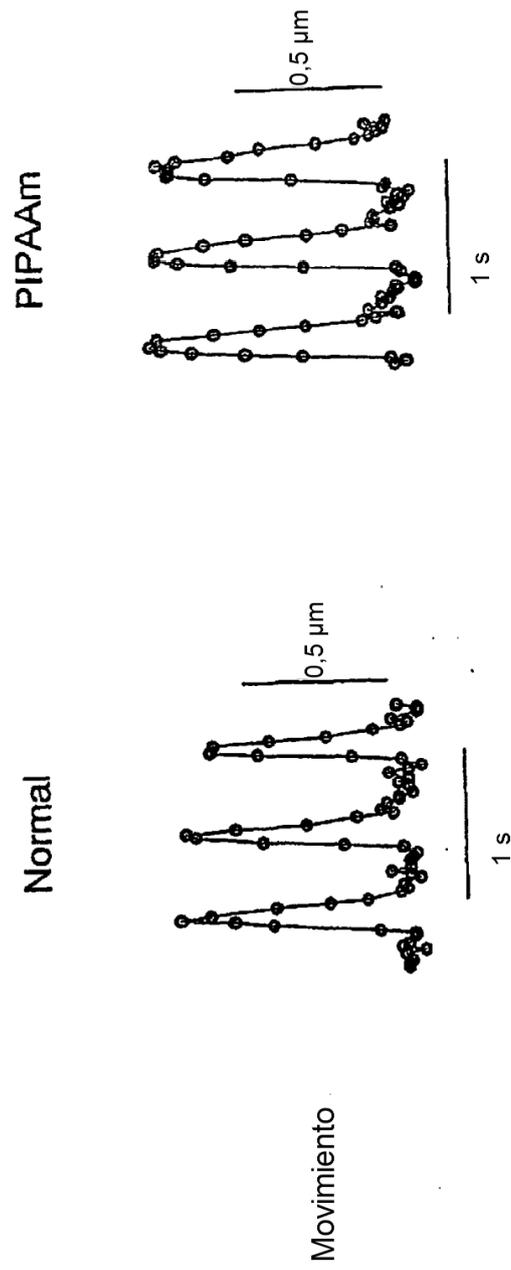
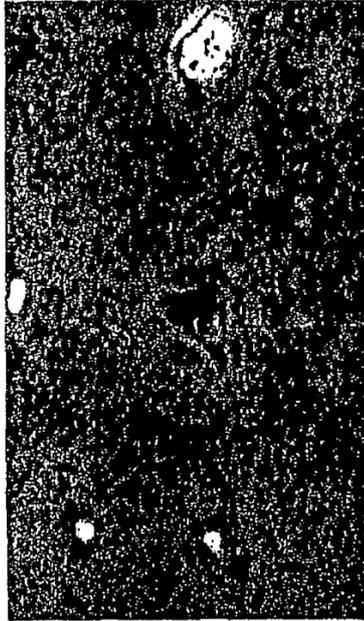
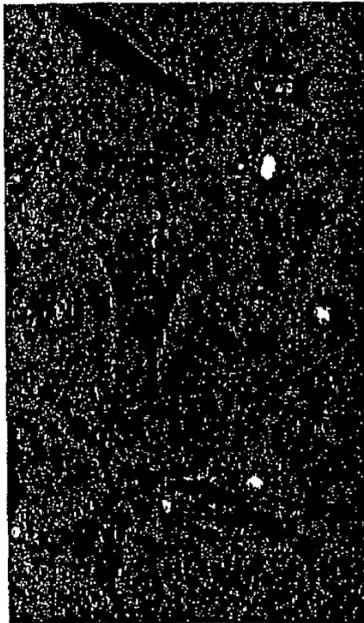


Fig. 3



Post



Pre

Fig. 4

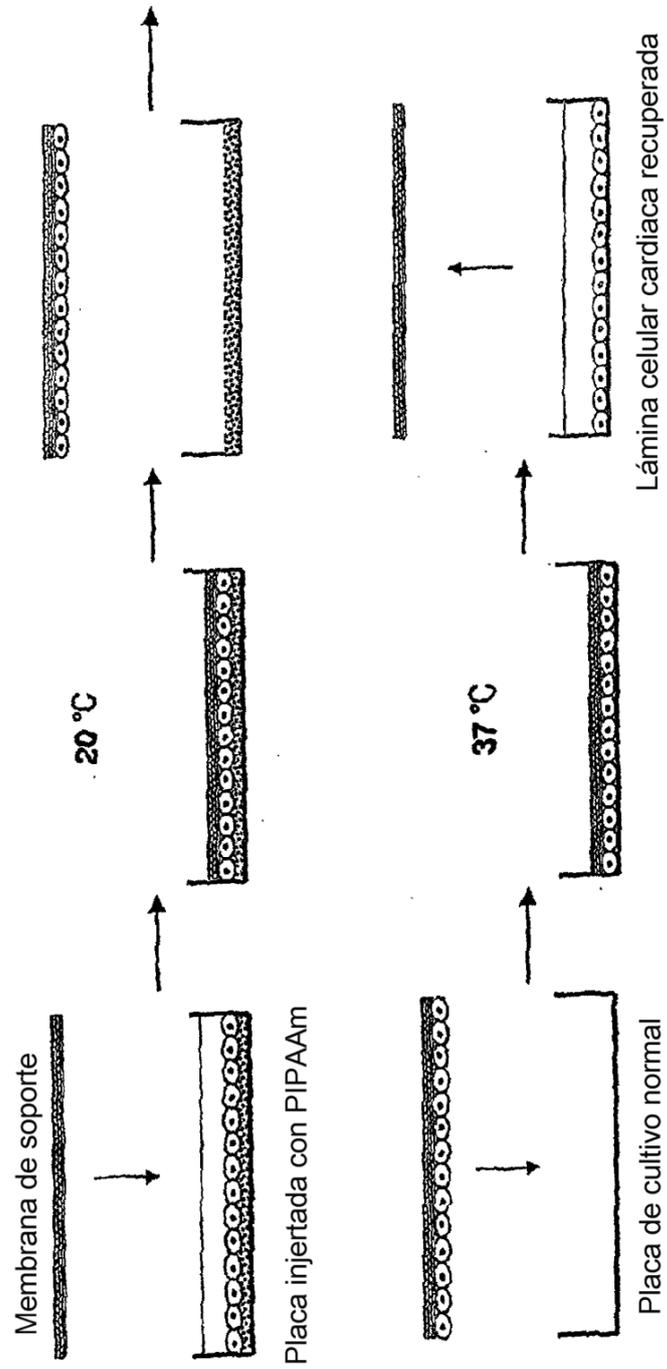


Fig. 5

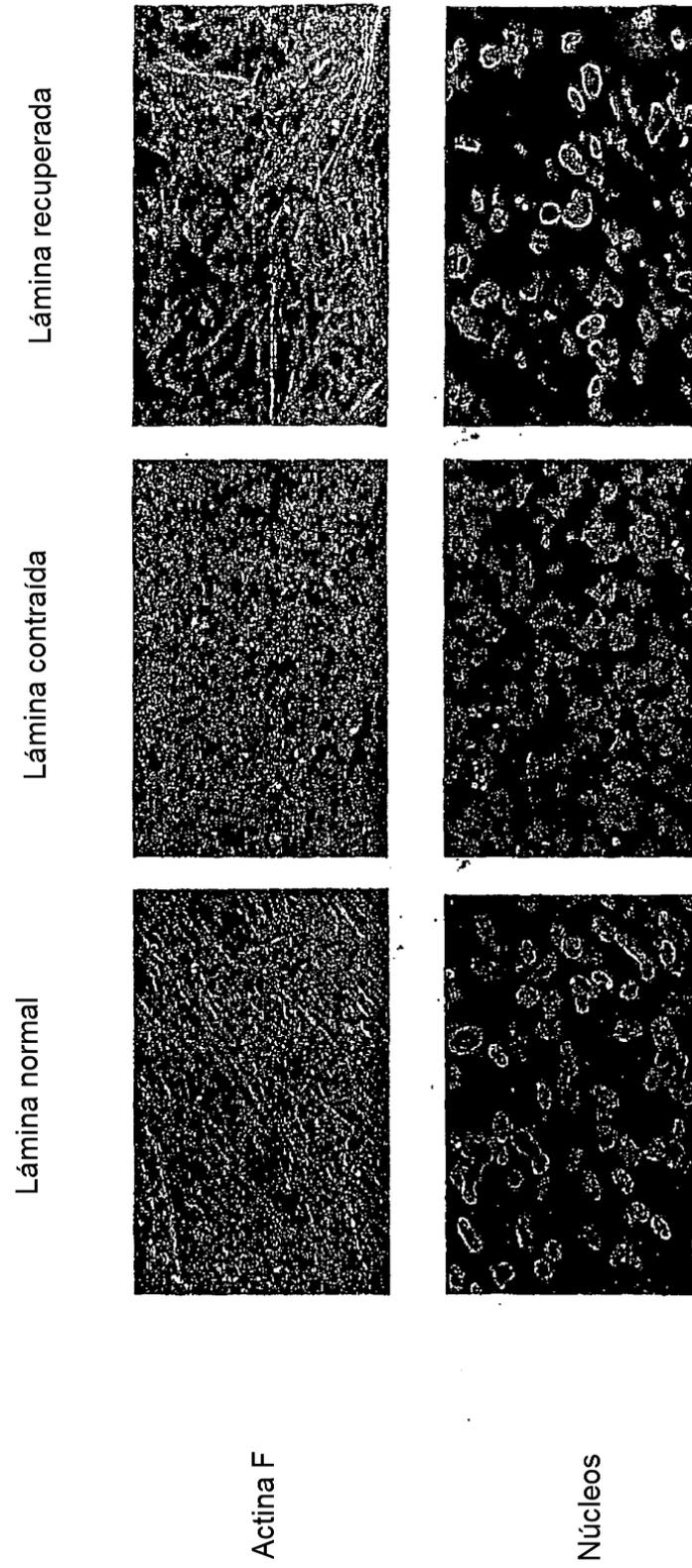


Fig. 6

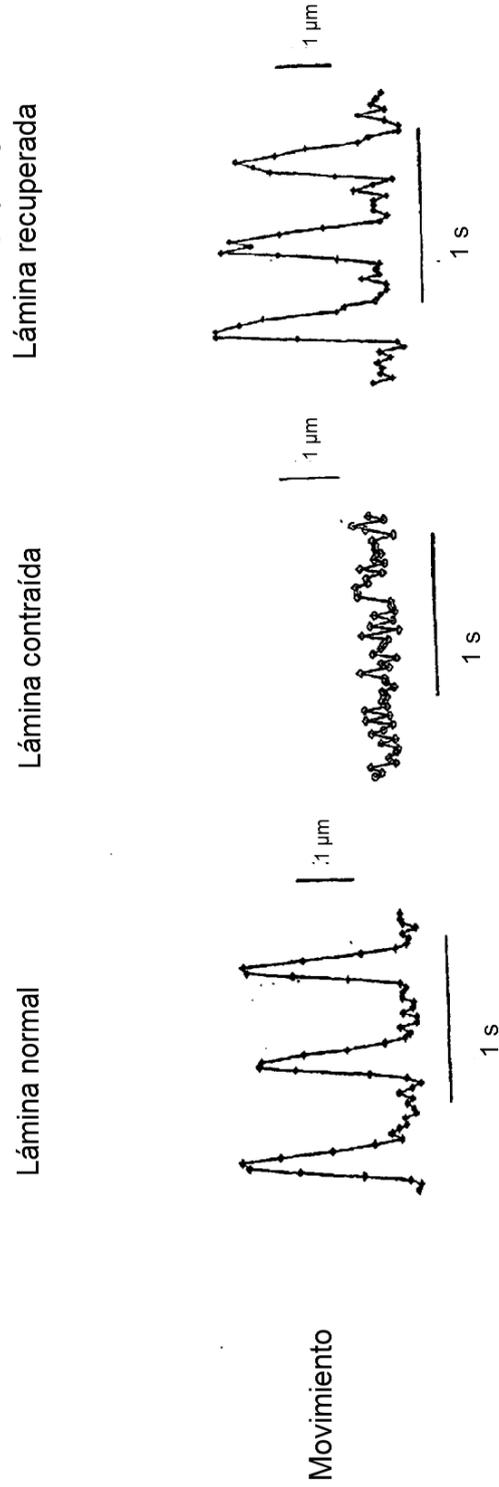


Fig. 7

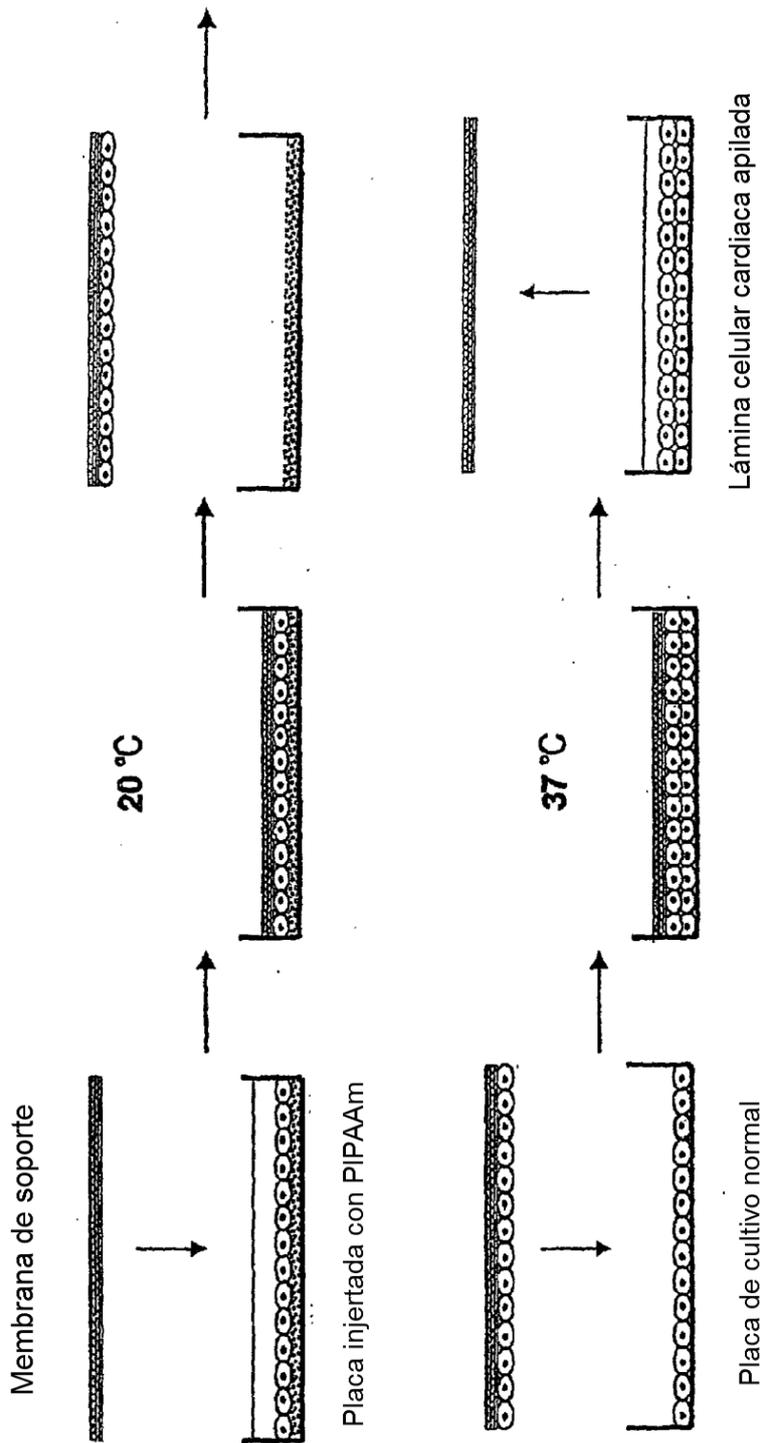


Fig. 8

Tinción con hematoxilina-eosina

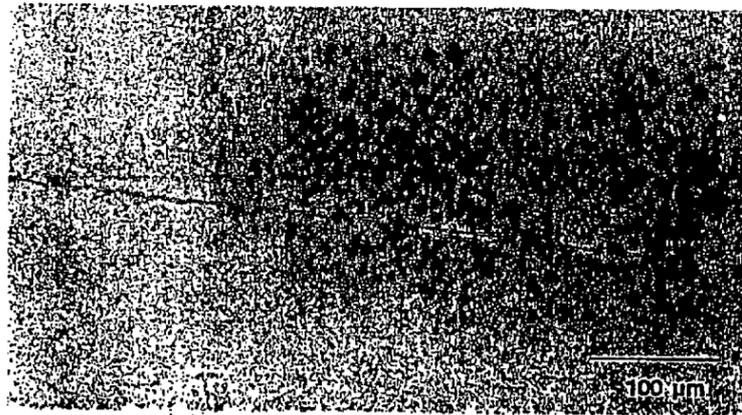


Lámina celular cardiaca (capa individual)

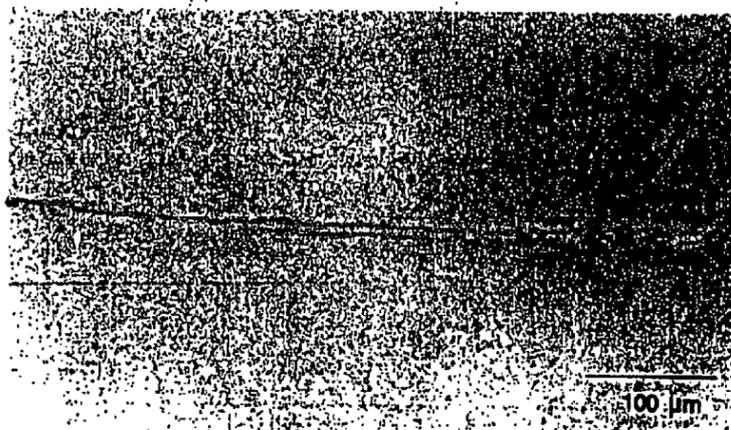


Lámina celular cardiaca (capas dobles)

Fig. 9

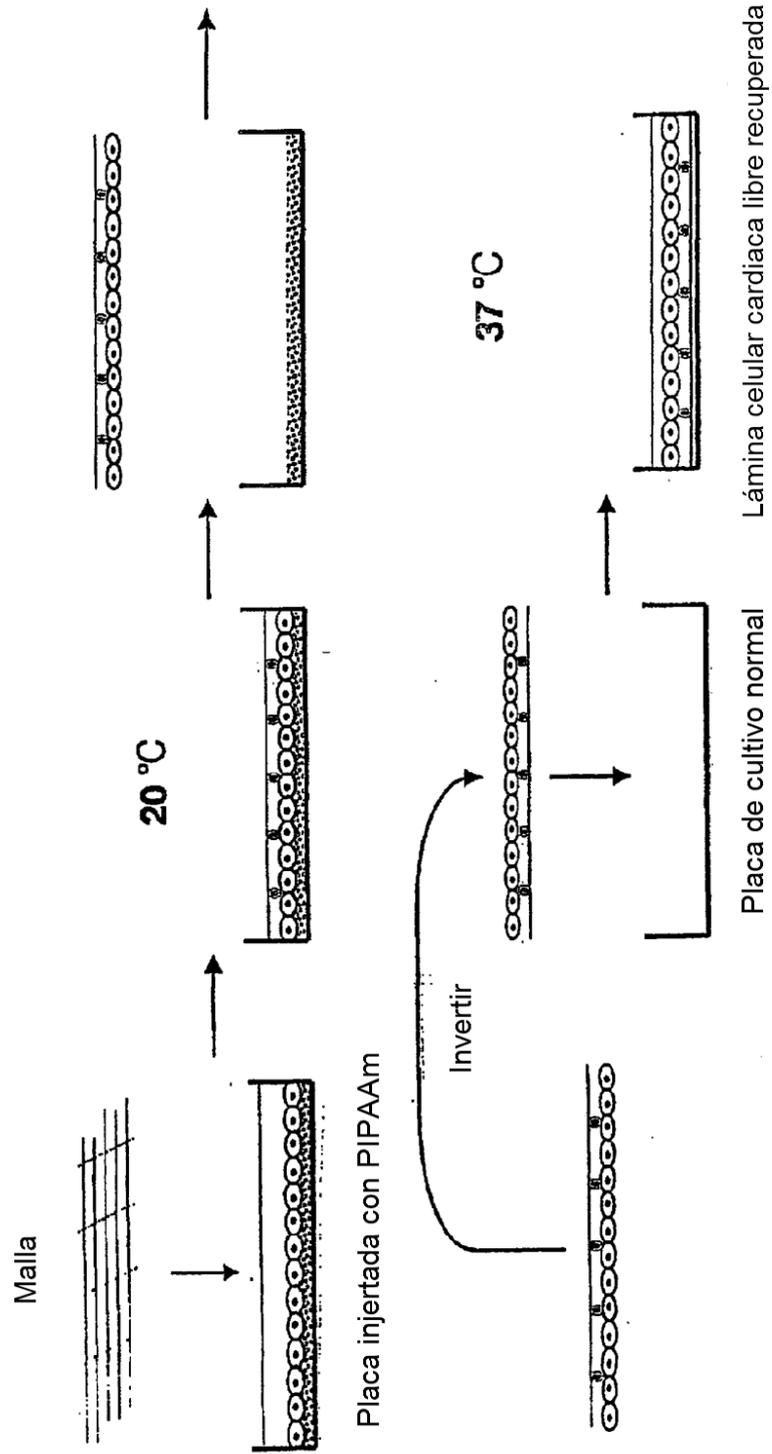


Fig. 10.

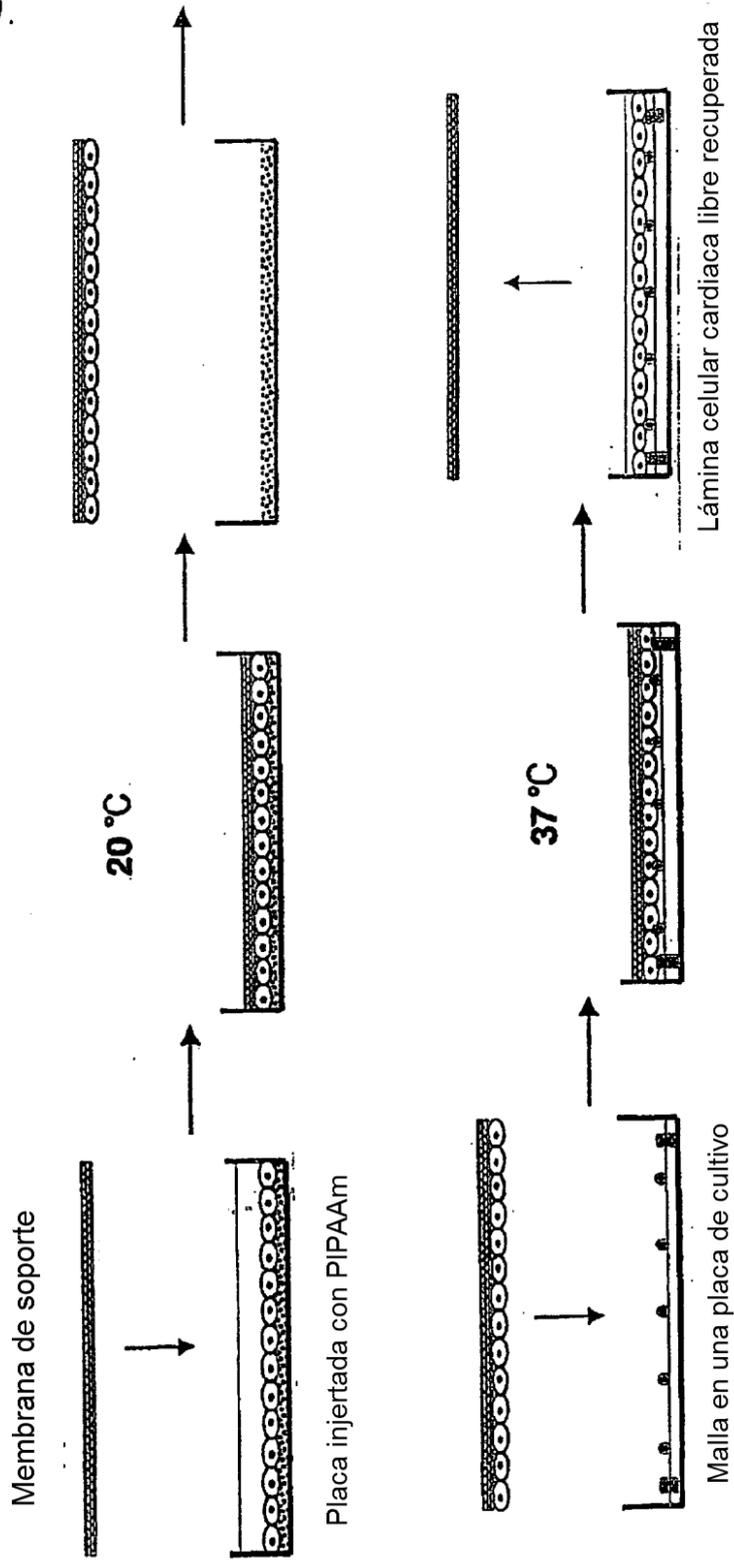
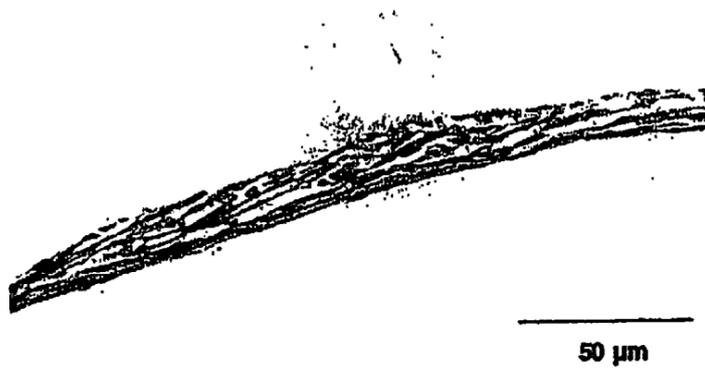
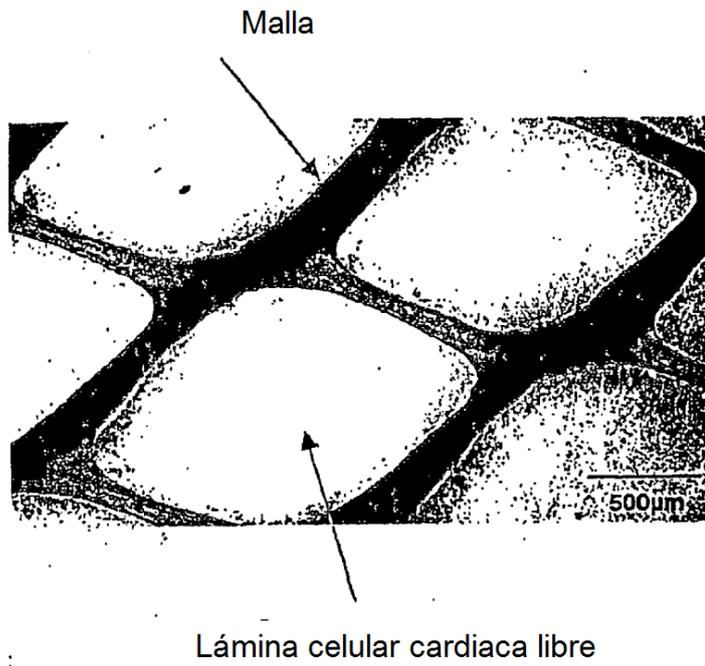
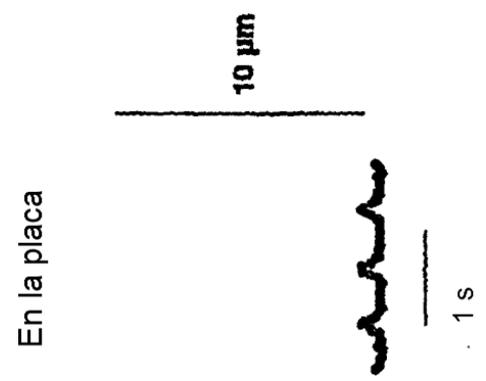
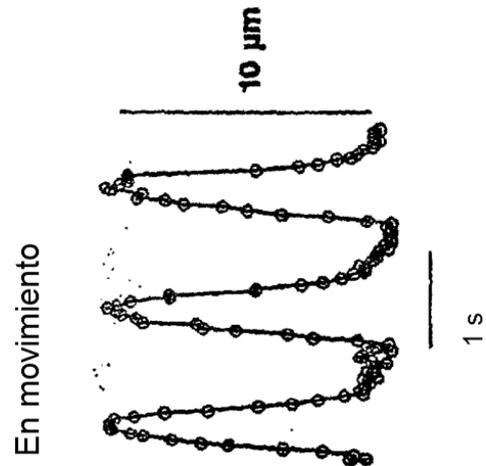
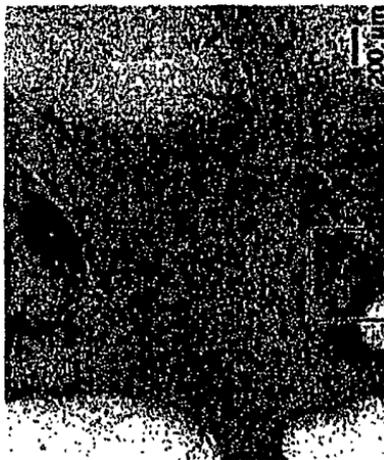


Fig. 11



Vista en sección transversal (H. E.)

Fig. 12



Movimiento

Fig. 13

Tinción con hematoxilina-eosina

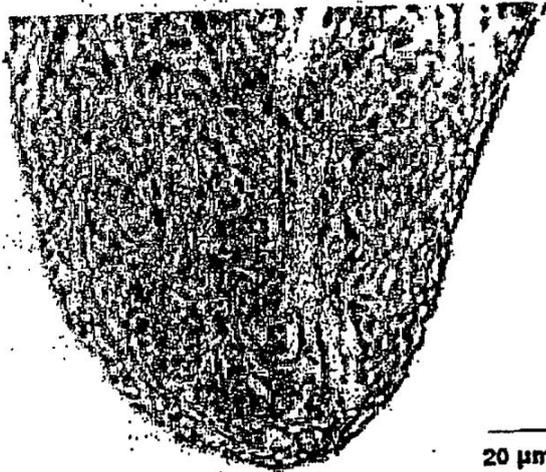
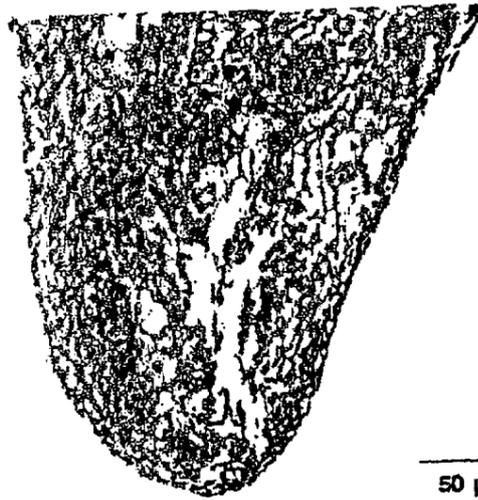


Fig. 14



Tejido cardiaco biodiseñado



Corazón embrionario de pollo (día 10)

Fig. 15

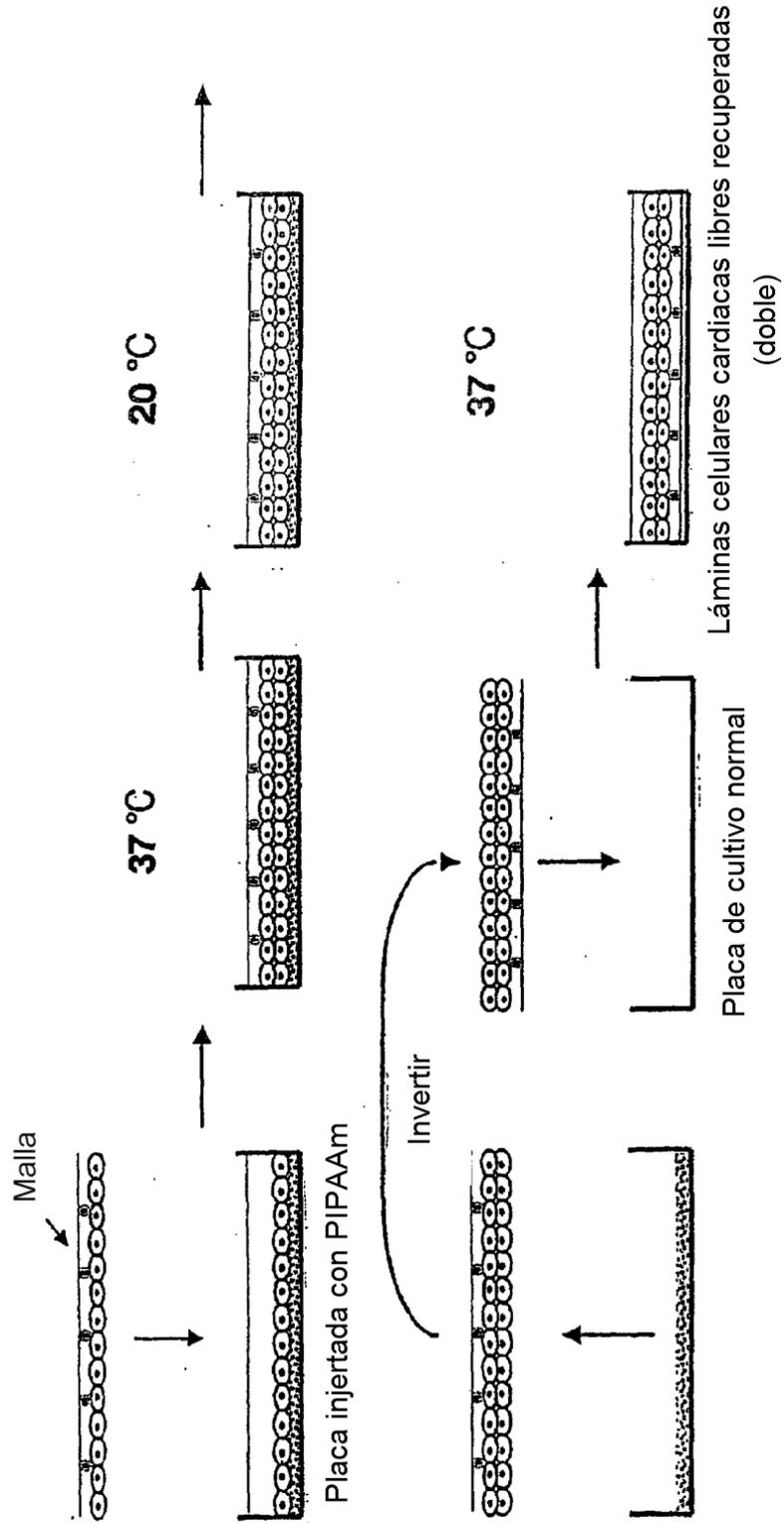
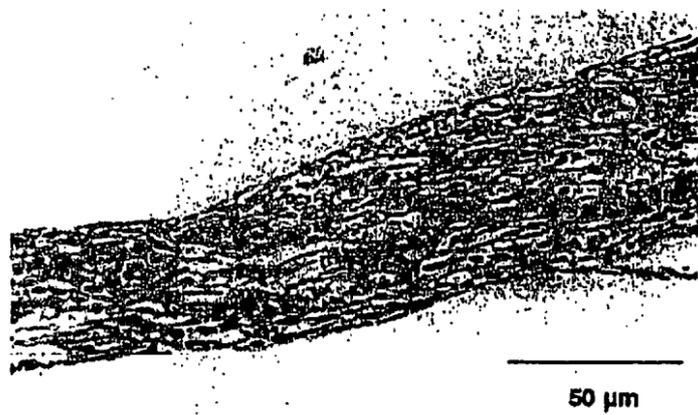
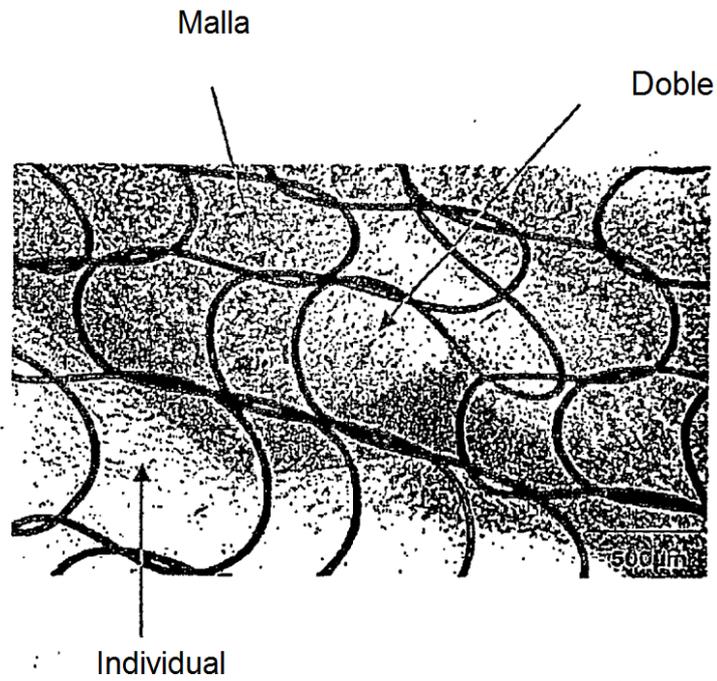


Fig. 16



Vista en sección transversal (H. E.)

Fig. 17

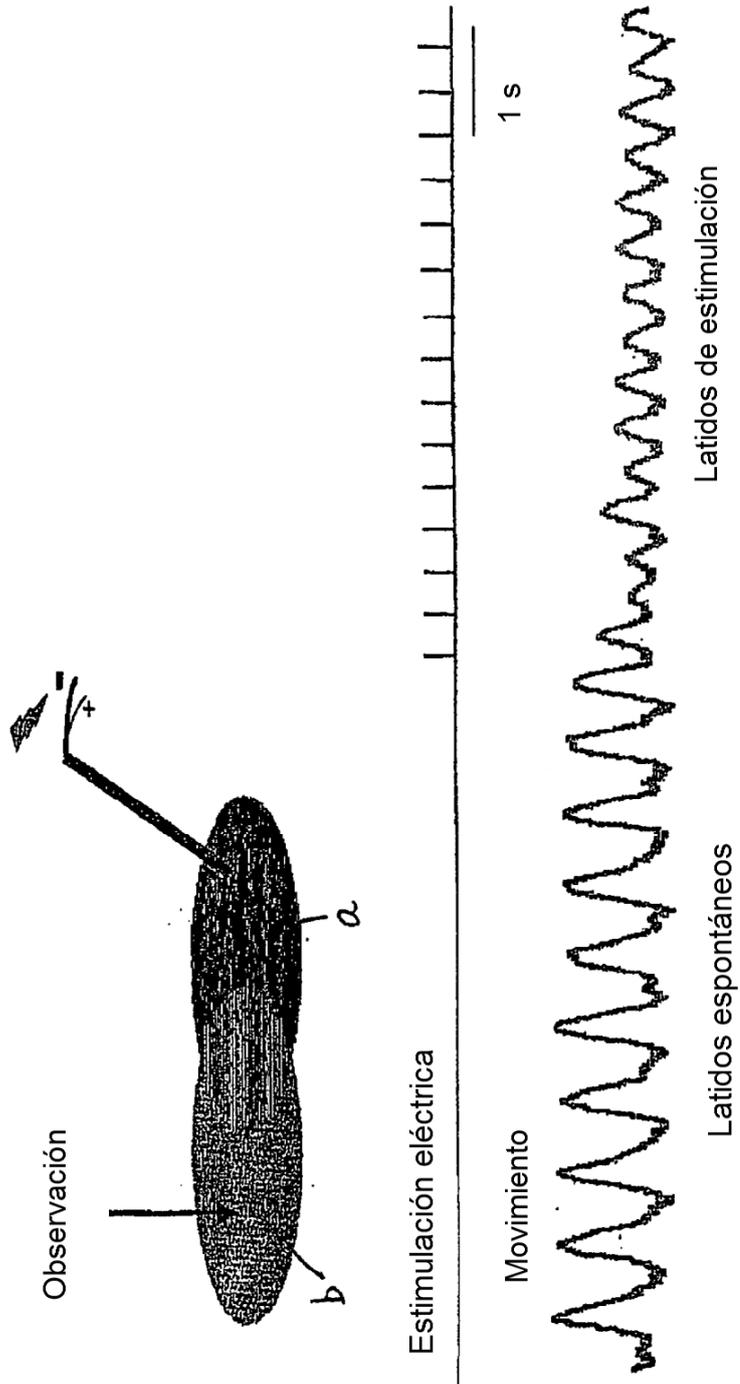
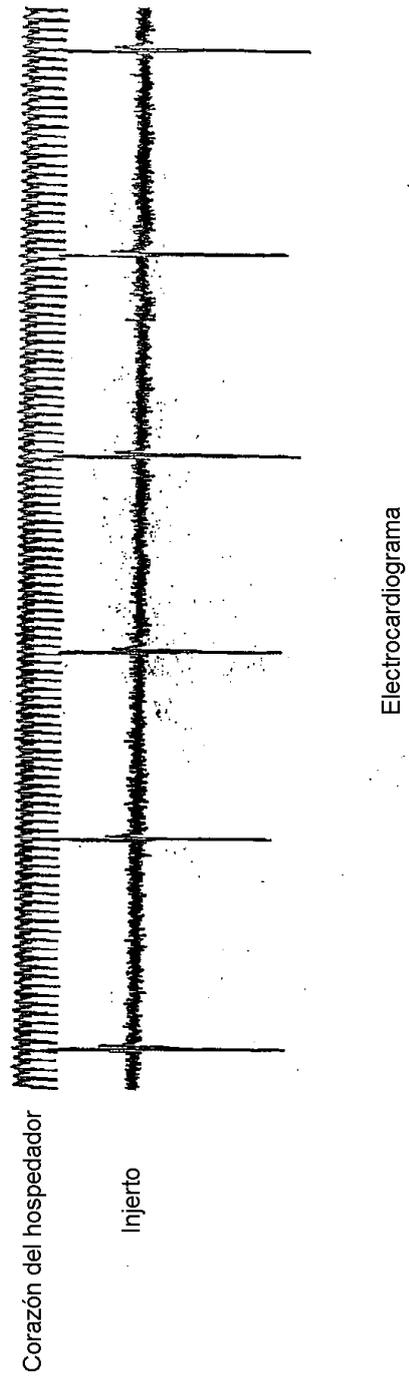
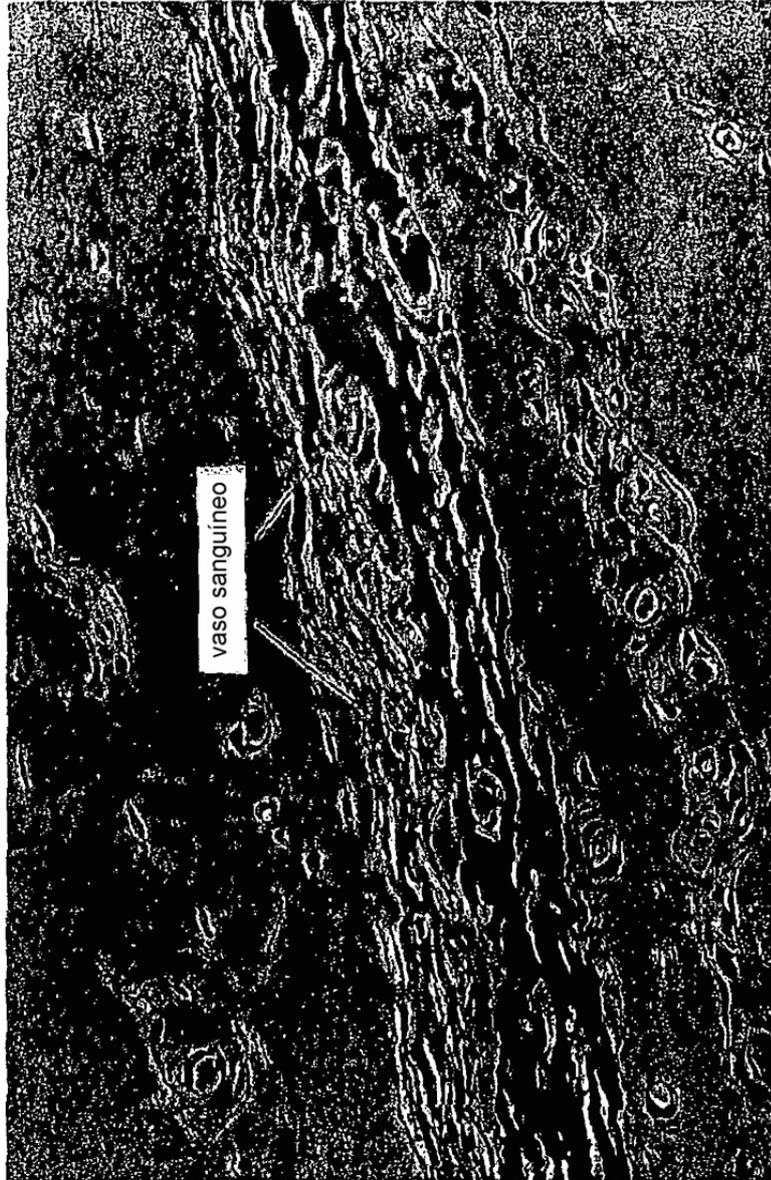


Fig. 18



Fig

Fig. 19



Tinción con azán

injerto miocárdico

Fig. 20

