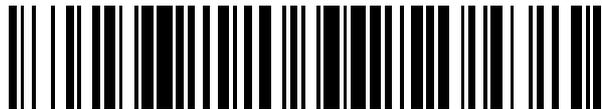


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 456 944**

51 Int. Cl.:

A61L 27/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2005 E 05769676 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2014 EP 1843803**

54 Título: **Estructura de trasplante con células de tejido diferenciadas terminalmente para la reconstrucción de un órgano**

30 Prioridad:

30.07.2004 DE 102004037184

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

24.04.2014

73 Titular/es:

**UROTISS GMBH (100.0%)
Budapester Strasse 3
01069 Dresden, DE**

72 Inventor/es:

**RAM-LIEBIG, GOUYA;
HAKENBERG, OLIVER y
WIRTH, MANFRED**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 456 944 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

Estructura de trasplante con células de tejido diferenciadas terminalmente para la reconstrucción de un órgano

5 La invención se refiere a una estructura de trasplante de tejido para la reconstrucción de un órgano humano o animal, un método para su preparación así como a un uso de la estructura de trasplante de tejido. La invención se refiere principalmente a una estructura de trasplante de tejido para la reconstrucción de la vejiga urinaria.

10 La reconstrucción de la vejiga urinaria puede ser necesaria debido a afecciones congénitas o adquiridas como, por ejemplo, mielomeningocele, distrofia de vejiga y cloacal, traumas, tumores malignos, disfunciones neuropáticas, inestabilidad de detrusor. La reconstrucción, es decir el reemplazo de las áreas lesionadas o enfermas de una vejiga urinaria, se efectúa mediante una estructura de trasplante de tejido que debe servir como una matriz para el crecimiento ulterior del tejido original.

15 En la actualidad, como matriz se usan principalmente segmentos del tracto gastrointestinal propios del paciente. De modo alternativo, pero menos frecuente, se emplean segmentos de intestino desepitelizados propios del paciente. Estas estructuras de trasplante de tejido presentan, no obstante, graves desventajas. De esta manera, la utilización de segmentos gastrointestinales está asociada con complicaciones como, por ejemplo, perturbaciones de electrolito, producción de moco, formación de cálculos o procesos degenerativos malignos. La razón de esto es el contacto constante de la mucosa gastrointestinal con la orina. La utilización de segmentos de intestino desepitelizados provoca complicaciones como el encogimiento del segmento.

20 Mientras que las matrices sin células son adecuadas para la reconstrucción de defectos más pequeños de una vejiga urinaria, es ventajoso el recubrimiento de la matriz en el caso de defectos más grandes (Yoo JJ, Meng J, Oberpenning F, Atala A. Bladder augmentation using allogenic bladder submucosa seeded with cells (Aumento de la vejiga usando submucosa de vejiga alógena sembrada con células). Urology. 1998 Feb;51(2): 221-5). Se ha propuesto recubrir una matriz que debe usarse para la reconstrucción de una vejiga urinaria con células uroteliales. De esta manera, la matriz debe protegerse contra la acción de descomposición de la orina ya que solo las células uroteliales forman una barrera adecuada contra la orina y de esta manera protegen la matriz contra la orina y además la calcificación y el rechazo.

25 Además, se sabe que solo las células superficiales, terminalmente diferenciadas, de la capa urotelial garantizan la funcionalidad correspondiente y principalmente forman una barrera contra la orina y sus componentes. La infiltración de las sustancias tóxicas de la orina se garantiza precisamente por las células uroteliales diferenciadas terminalmente las cuales son esenciales de esta manera para el mantenimiento de los gradientes osmóticos de la vejiga urinaria y de la homeostasis de tejido.

30 Sin embargo, células uroteliales menos diferenciadas no ofrecen la funcionalidad de las células uroteliales diferenciadas terminalmente. Una estructura de trasplante de tejido hecha de una matriz que está recubierta con células uroteliales menos diferenciadas puede conducir, por consiguiente, a infección, calcificación y rechazo, entre otras, debido a la función deficiente de estas células uroteliales.

35 A fin de evitar un rechazo de la matriz recubierta con células uroteliales, sería de ventaja el uso de células uroteliales autólogas. Sin embargo, esto está asociado con dificultades: mediante biopsia se ha encontrado que las células uroteliales obtenidas de una vejiga vieja y enferma presentan solamente un potencial de regeneración limitado (Cheng EY, Kropp BP. Urologic tissue engineering with small-intestinal submucosa: potential clinical applications. (Diseño de tejido urológico con submucosa de intestino delgado: aplicaciones clínicas potenciales) World J Urol. 40 2000 Feb; 18(1):26-30). Además, las células uroteliales obtenidas de esta manera pierden su fenotipo característico in vivo durante la proliferación (Del cultivo celular hasta el diseño de tejido: W.W: Minuth, R. Strehl, K. Schumacher. Pabst science publishers), de modo que es difícil re-diferenciar estas células uroteliales para obtener células con funcionamiento normal altamente diferenciadas.

45 Estructuras de tejido autólogas viables son conocidas de [1-5]. La capacidad de regeneración limitada de las células uroteliales que se han obtenido de vejigas urinarias viejas y enfermas se conoce de [6]. La pérdida del fenotipo característico de las células uroteliales durante la proliferación in vivo se describe en [7]. La influencia de la matriz extracelular se discute en detalle en las referencias [8-16].

WO 98/06445 A1 divulga un método para la reconstrucción de tejido mediante colonización de vejigas urinarias-mucosa con células.

50 Scriven et al. J Urol 1997, 158: 1147-52, divulgan el cultivo de células uroteliales sobre estroma urotelial desepitelizado.

5 El objetivo de la invención es eliminar las desventajas según el estado de la técnica. Debe proporcionarse principalmente una estructura de trasplante de tejido para la reconstrucción de un órgano humano o animal, principalmente una vejiga urinaria que presente en la mayor medida posible las mismas características funcionales protectoras que el tejido urotelial nativo sano y de esta manera apoye la generación posterior de la capa muscular sobre la membrana después del implante. Además, debe proporcionarse un método para la preparación de una estructura de trasplante de tejido de este tipo así como un uso de la estructura de trasplante de tejido.

Este objetivo se logra mediante las características de las reivindicaciones 1, 7 y 12. Modalidades convenientes de las invenciones resultan de las características de las reivindicaciones dependientes.

10 De conformidad con la invención está prevista una estructura de trasplante de tejido para la reconstrucción de una vejiga urinaria humana o animal que comprende una membrana biológicamente compatible, que contiene colágeno, y una o varias capas de células tisulares específicas del órgano sobre la membrana, en cuyo caso la capa externa de las células tisulares específicas del órgano es una capa de células tisulares, específicas del órgano, terminalmente diferenciadas y las células tisulares específicas del órgano son células uroteliales.

15 La expresión "células tisulares específicas del órgano" debe entenderse en la presente en el sentido que las células tisulares del mismo órgano o de un órgano igual, que debe ser reconstruido, se aplican sobre la membrana. Si, por ejemplo, debe reconstruirse una vejiga urinaria, entonces por células específicas del órgano deben entenderse en la presente las células uroteliales.

Los órganos son unidades funcionales del cuerpo. Un ejemplo preferido es la vejiga urinaria.

20 En una modalidad preferida se proporciona una estructura de trasplante de tejido para la reconstrucción de la vejiga urinaria que comprende una membrana biológicamente compatible, que contiene colágeno, y una o varias capas de células uroteliales sobre la membrana, en cuyo caso la capa exterior de las células uroteliales es una capa de células uroteliales terminalmente diferenciadas.

Sí sobre la membrana se forma solamente una capa de células tisulares entonces esta capa representa la capa externa que es una capa de células tisulares terminalmente diferenciadas.

25 La capa externa es una capa de células tisulares terminalmente diferenciadas. Las otras capas son capas de células tisulares diferenciadas de modo no terminal.

Los términos "membrana" y "matriz " se usan en la presente como sinónimos, en tanto no se indique nada diferente. La membrana debe contener los componentes de la matriz extracelular (MEC), sus factores de crecimiento. De manera preferente la membrana es una membrana biológica.

30 Por una membrana que contiene colágeno, en la presente debe entenderse una membrana a base de colágeno.

Por reconstrucción se entiende el reemplazo de regiones lesionadas o enfermas de una vejiga urinaria humana o animal.

35 Por inducción estromal se entiende la proliferación de las células tisulares inducida por estroma. Preferentemente, la inducción estromal es una inducción fibroblástica. La inducción estromal debe permitir una proliferación de las células tisulares que sea suficiente para cubrir áreas mayores de la membrana (hasta 40 cm²).

40 El número de las capas de células tisulares sobre la membrana debe ser preferiblemente de uno a siete, más preferible de dos a siete y de la manera más preferida de cuatro a siete, en cuyo caso la capa externa es una capa de células tisulares diferenciadas de modo terminal. Si debe usarse la estructura para la reconstrucción de un órgano humano, las células tisulares son preferentemente de origen humano autólogo. Preferentemente solamente la capa externa es una capa de células tisulares diferenciadas de modo terminal.

45 Dentro de tejidos y órganos se hace posible la comunicación celular por medio de la estructura molecular compleja de la matriz extracelular (MEC). Las señales bioquímicas y biofísicas de la matriz extracelular participan, entre otras, fundamentalmente en la regulación de actividades celulares tales como la adhesión, morfogénesis, migración, proliferación, diferenciación y creación de función. La función de la matriz extracelular en la vejiga urinaria y su interacción con las células respecto del desarrollo, regeneración y patogénesis también son muy importantes. Por ejemplo, los factores dependientes de la edad provocan modificaciones en la ultraestructura de la matriz extracelular y por consiguiente en el potencial de regeneración del tejido de la vejiga.

50 La membrana biológicamente compatible, que contiene colágeno, es preferiblemente un tejido que proviene de un mamífero, principalmente un tejido de la submucosa o de la dermis de un humano o un porcino (cerdo). La obtención de este tejido es conocida.

Por consiguiente, la elección de la membrana adecuada con los componentes correspondientes de la matriz extracelular y los procesos específicos de señal de estos componentes respecto de su función orientadora y reguladora es el primer requisito para el éxito de la expansión celular y la diferenciación de las células epiteliales.

5 Por lo tanto, la preparación de las membranas acelulares debe impedir la remoción completa de los factores de crecimiento importantes y de otros componentes de la matriz extracelular a fin de preparar un medio tan natural como sea posible para el cultivo celular y de apoyar las interacciones bidireccionales y dinámicas entre las células uroteliales aplicadas y los componentes de la matriz.

La membrana biológicamente compatible, que contiene colágeno, es preferiblemente una submucosa intestinal, una submucosa de vejiga urinaria acelular o una matriz dérmica acelular.

10 Membranas biológicamente compatibles, que contienen colágeno, particularmente adecuadas son

15 - SIS ("small intestinal submucosa" o submucosa del intestino delgado), que se obtiene del intestino delgado del cerdo, contiene una combinación de distintos tipos de colágeno, glicoproteínas, proteoglicanos y factores de crecimiento funcionales que desempeñan un papel en la migración celular, el crecimiento y la diferenciación (15). La forma liofilizada, casi acelular de esta membrana (LSIS, "lyophilized small intestinal submucosa") se encuentra disponible en la empresa Cook Biotech (Mönchengladbach, Alemania). La forma no liofilizada de SIS (NLSIS, nonlyophilized small intestinal submucosa), tal como la ABS (submucosa de vejiga urinaria acelular) y ADM (matriz dérmica acelular), pueden obtenerse mediante tratamiento enzimático y a continuación químico de modo acelular, a fin de minimizar su inmunogenicidad después del trasplante de la estructura formada con esta base.

20 - ABS ("acelular bladder submucosa" o submucosa de vejiga urinaria acelular), que se obtiene a partir de la submucosa de la vejiga urinaria de un animal o una persona, es una matriz específica de órgano que permite una generación fisiológica del tejido de vejiga urinaria antes y después del trasplante.

25 - ADM (Acellular Dermal Matrix o matriz dérmica acelular), la cual se obtiene de la piel, puede prepararse exclusivamente de tejidos propios del paciente y de esta manera no representa un riesgo de infección del donante al receptor. Si se usa ADM conjuntamente con el suero propio del paciente, se obtiene entonces un sistema completamente autólogo, es decir un sistema sin suero fetal y sin membrana alogénica o xenogénica.

La estructura de trasplante de tejido según la invención puede obtenerse mediante un método que comprende los siguientes pasos:

- (a) aplicación de células tisulares específicas de órgano sobre la membrana biológicamente compatible que contiene colágeno;
- 30 (b) proliferación de las células tisulares específicas de órgano aplicadas por medio de inducción estromal en un medio de cultivo con la formación de una o varias capas de células tisulares específicas de órgano sobre la membrana; y
- (c) diferenciación terminal de la capa externa de las células tisulares específicas del órgano, expandidas con inducción estromal adicional, reduciendo factores mitogénicos en el medio de cultivo, en cuyo caso las células tisulares específicas del órgano son células uroteliales.
- 35

Una estructura de trasplante de tejido para la reconstrucción de la vejiga urinaria puede obtenerse, por consiguiente, mediante un método que comprende los siguientes pasos:

- (a) aplicación de células uroteliales sobre la membrana biológicamente compatible que contiene colágeno;
- 40 (b) proliferación de las células uroteliales aplicadas por medio de inducción estromal en un medio de cultivo con la formación de una o varias capas de células uroteliales sobre la membrana; y
- (c) diferenciación terminal de la capa exterior de las células uroteliales expandidas con inducción estromal adicional disminuyendo factores mitogénicos en el medio de cultivo.

45 Por disminución de factores mitogénicos se entiende aquí la disminución de la concentración de suero (por ejemplo, de la concentración de suero bovino fetal o del suero autólogo), mientras que la concentración de otras sustancias nutritivas estromales se mantiene constante.

Los pasos (b) y (c) se realizan con el fin de expandir las células tisulares, por ejemplo las células uroteliales, mientras se mantiene su fenotipo epitelial, diferenciarlas y a continuación diferenciar de modo terminal la capa

5 externa de las células tisulares. El medio de cultivo tiene que seleccionarse, por lo tanto, para que la membrana seleccionada, en cooperación con condiciones de cultivo adaptadas de modo correspondiente, induzcan primero la migración y la división y luego la maduración funcional de las células cultivadas y de esta manera, tal como en el caso de la reconstrucción de la vejiga urinaria, hagan posible el desarrollo de una estructura urotelial funcional, altamente diferenciada.

10 Para este propósito, las células tisulares aplicadas a la membrana en el paso (a) deben cultivarse en un medio de cultivo que contiene suero bovino fetal (SBF) para la proliferación y diferenciación, así como para la diferenciación terminal de la capa externa. Es particularmente ventajoso cultivar las células tisulares aplicadas a la membrana en el paso (a) para la proliferación y diferenciación terminal en un medio condicionado por fibroblastos (MCFB), que contiene suero bovino fetal (SBF).

El medio de cultivo contiene preferentemente 5 al 10% de SBF.

15 A continuación del paso (b) debe disminuirse la concentración de SBF a fin de provocar una diferenciación terminal de las células superficiales después de la suficiente expansión de las células tisulares sobre la membrana. Preferiblemente, la concentración de SBF se disminuye en al menos 50%, particularmente preferible la concentración de SBF se reduce desde 5 a 10% hasta 0 a 1%.

Por una expansión suficiente se entiende aquí que varias capas de células tisulares cubren completamente la membrana.

20 Para la preparación de una estructura de trasplante de tejido para aplicación médica, el método para la preparación de una estructura de trasplante de tejido para la reconstrucción de la vejiga urinaria comprende la recuperación de células uroteliales a partir de pequeñas biopsias de vejiga urinaria y su expansión (primera) en condiciones convencionales. A continuación, las células uroteliales se aplican sobre las membranas biocompatibles a base de colágeno. Después de expansión adicional suficiente mediante inducción estromal, las células uroteliales se llevan hacia la diferenciación terminal con inducción estromal disminuyendo factores mitogénicos.

25 Las estructuras de trasplante de tejido de acuerdo con la invención son estructuras que debido a la diferenciación terminal de la capa celular superficial corresponden al fenotipo in vivo y por consiguiente son iguales en su función al tejido nativo; en el caso de una vejiga urinaria, entonces al tejido uroteliales nativo. De esta manera pueden formarse, por ejemplo, estructuras uroteliales que funcionan por primera vez, las cuales garantizan una protección adecuada de la membrana biológica contra la orina. Utilizando medios condicionados con fibroblastos autólogos puede impedirse la utilización de capas nutrientes xenogénicas así como de otros aditivos disponibles
30 comercialmente tal como el factor de crecimiento EGF. Esto es una parte favorable financieramente, por otra parte se allanan los reparos respecto a la toxicidad, carcinogenicidad o la transferencia de enfermedades. En lugar de SBF puede usarse suero autólogo de modo que no estén contenidos aditivos xenogénicos en el medio de cultivo.

El suero autólogo puede obtenerse mediante métodos conocidos a partir de la sangre del paciente que va a tratarse.

La invención se explica en mayor detalle a continuación por medio de ejemplos con referencia a los dibujos.

35 La figura 1 muestra una representación gráfica de los métodos (1) a (4) para la proliferación y diferenciación terminal;

La figura 2 muestra un registro obtenido por medio de microscopía de contraste de fases de una monocapa de mucosa de vejiga urinaria porcina;

40 La figura 3 muestra una tinción con DAPI de una estructura de vejiga urinaria porcina sobre LSIS (Fig. 3a: capas múltiples visibles de los núcleos celulares sobre la membrana;

Las figuras 3b y 3c muestran la actividad mitótica de los núcleos que se dividen de las células sobre LSIS);

45 La figura 4 muestra cortes en parafina de estructuras de células uroteliales sobre membranas acelulares sin inducción con fibroblastos (Fig. 4A y Fig. 4B muestran tinción con hematoxilina-eosina sobre ABS; las figuras 4C y 4D muestran la inmunohistoquímica con PAN-citoqueratina sobre LSIS; las figuras 4E y 4F muestran tinción con hematoxilina-eosina sobre ADM);

La figura 5 muestra una comparación histológica de células uroteliales que se adhirieron a la submucosa de vejiga urinaria acelular y crecieron allí (la figura 5A muestra células uroteliales que se cultivaron sin inducción con fibroblastos; la figura 5B muestran células uroteliales que se cultivaron con inducción de fibroblastos);

La figura 6 muestra un análisis histológico, histoquímico e inmunohistoquímico de estructuras de células uroteliales porcinas y humanas sobre ABS (las figuras 6A, 6B y 6D muestran después de la disminución de la concentración de SBF desde 5% a 1%; las figuras 6C y 6E muestran vejigas urinarias porcinas nativas; la figura 6F muestra una estructura de células uroteliales porcinas y la figura 6G muestra la estructura de células uroteliales humanas);

- 5 La figura 7 muestra un análisis histológico, histoquímico e inmunohistoquímico de estructuras de células uroteliales porcinas y humanas sobre LSIS (la figura 7A muestra tinción con hematoxilina-eosina; la figura 7B muestra una tinción con AE1/AE3; la figura 7C muestra una tinción con WGA);

- 10 La figura 8 muestra una capa de parafina de estructuras de células uroteliales sobre NLSIS, en cuyo caso la concentración de SBF se mantuvo constante durante el cultivo (la figura 8A: muestra un aumento de 40 veces; la figura 8B: muestra un aumento de 10 veces); y

La figura 9 muestra una representación esquemática de una estructura de células uroteliales de acuerdo con la invención.

Ejemplos

- 15 Los siguientes ejemplos ilustran el método de la invención para preparar estructuras de trasplantes de tejidos de vejigas urinarias.

En tanto no se indique nada especial, las abreviaturas usadas tienen el siguiente significado:

BCECF 2',7'-bis-(2-carboxietil)-5/6-carboxifluoresceína

DAPI 4'-6-Diamidino-2-fenilindol

DMEM Dulbecco's modified Eagle's Medium o medio de cultivo modificado Eagle de Dulbecco ,

- 20 MEC matriz extracelular,

EGF factor de crecimiento epidérmico

FB Fibroblasto

SBF suero bovino fetal

KGM medio de crecimiento de queratinocitos

- 25 UC células uroteliales

PBS solución salina fisiológica amortiguada con fosfato

PI yoduro de propidio,

WGA aglutinina de germen de trigo

FBCM medio condicionado por fibroblastos

- 30 Materiales y métodos

Membranas acelulares biológicas: submucosa liofilizada de intestino delgado (LSIS) se encuentra comercialmente disponible en Cook Biotech (Mönchengladbach, Alemania). Para preparar submucosa no liofilizada de intestino delgado (NLSIS), submucosa acelular de vejiga (ABS) y matriz dérmica celular (ADM) se trataron muestras de cerdo con 1 % de TritonX-100 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Alemania) durante 48 h.

- 35 Las membranas tienen respectivamente un tamaño de hasta 40 cm².

Cultivos de células uroteliales y de fibroblastos: segmentos de la vejiga porcina se obtuvieron a partir de ocho animales muertos. Las muestras porcinas se han elegido debido a su similitud con la vejiga humana [15]. Adicionalmente se obtuvieron muestras de tejido humano de la vejiga urinaria (n = 4) adicionalmente de los pacientes adultos que tuvieron que someterse a cirugía de vejiga.

Los tejidos mucosos y submucosos se trituraron por separado, se digirieron con colagenasa B (200 u/ml) (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ, USA), se concentraron mediante centrifugación (2000 rpm), se pusieron en una atmósfera húmeda de 95% aire y 5% dióxido de carbono. Las células uroteliales y los fibroblastos se cultivaron respectivamente en el medio de crecimiento de queratinocito suplementario (KGM) (CellSystems Biotechnologie, St. Katharinen, Alemania) o el medio Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), se mezclaron con 5 a 10 % de SBF. Se realizaron análisis inmunocitoquímicos con AE1/AE3 (concentración de 1 : 150), vimentina (1 : 100) y α -actina del músculo liso (1 : 100) (Dako, Glastrup, Dinamarca).

Se aplicaron números definidos de las células uroteliales sobre la superficie de las capas de membrana (10^5 células uroteliales /cm²) y dos veces a la semana por hasta 28 días se trataron con uno de los siguientes métodos (1) a (4):

10 (1) las células uroteliales se cultivaron con DMEM, se suplementaron con 10 % de SBF (grupo 1). El grupo 1 es un grupo de control;

(2) las células uroteliales se cultivaron con un medio libre de suero, se suplementaron con factor de crecimiento epidérmico (EGF), extracto de hipófisis bovino (BPE), hidrocortisona, transferrina, insulina y epinefrina, en la concentración recomendada por el fabricante (grupo 2). El grupo 2 es un grupo de control;

15 (3) Los fibroblastos se cultivaron conjuntamente en DMEM con 5 % de SBF en el fondo de un sistema de cultivo Transwell (grupo 3). El grupo 3 es un grupo de control;

(4) las células uroteliales se cultivaron con un medio condicionado por fibroblastos (FBCM), suplementado con SBF (5 % por los primeros 14 días y 1 % por las siguientes dos semanas) (Grupo 4).

20 La figura 1 es una representación gráfica de los métodos (1) a (4). Las células uroteliales y fibroblastos se cosecharon de una vejiga urinaria por medio de tratamiento enzimático. Después de una (primera) expansión se cultivaron las células uroteliales sobre las membranas indicadas usando los medios de cultivo según los métodos (1) a (4). Los sistemas de cultivo condicionados por fibroblastos (grupos 3 y 4) mostraron un número más alto de capas de células en comparación con los sistemas no condicionados por fibroblastos (grupos 1 y 2). La disminución de estímulos mitogénicos después del día 14 en el grupo 4 indujo en el mismo lapso de tiempo un alto grado de diferenciación de las células uroteliales.

25 Todos los medios usados en los métodos (1) a (4) fueron suplementados primero con 0,09 mM de calcio. Para la formación de capas se llevaron los cultivos al área superficial aire-líquido con una concentración de calcio aumentada (2,5 mM).

30 Medio condicionado por fibroblastos-vejiga urinaria: después del cultivo primario se transfirieron 10^6 fibroblastos en un recipiente para cultivo celular de 75 cm² y se mezclaron con DMEM, se suplementaron con 5 % o 1 % de SBF. A una confluencia de 90% se cambiaron los medios y 24 horas después se recogieron, se filtraron (Falcon, BD, Heidelberg, Alemania) y se almacenaron a 4 °C.

Adhesión celular, proliferación y viabilidad

35 A fin de determinar la densidad de superficie de las células cultivadas sobre las membranas, el número de células se sustrajo del número de células en la suspensión después de la separación del plato de cultivo 2 y 10 horas después de la siembra sobre la membrana. Se realizaron ensayos de proliferación con 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) los días 2, 14 y 28 después de la aplicación. Se realizaron ensayos de viabilidad 6 h, 14 días y 28 días con BCECF (2',7'-bis-2-carboxietil-5- y -6-carboxifluoresceína) y PI (yoduro de propidio) (ambos de Mobitec, Gotinga, Alemania) (5 mmol respectivamente, incubación por 20 min).

40 Tintura histológica, histoquímica e inmunohistoquímica de células cultivadas sobre membranas

45 Los materiales se fijan en 4% de formaldehído amortiguado neutralmente durante 24 horas y se incrustan en parafina. Las secciones se tinturaron con hematoxilina-eosina, o, de otra manera, se usaron para la inmunohistoquímica y tinturado de lectina con aglutinina de germen de trigo (WGA). La dilución del anticuerpo primario para PAN-citoqueratina (AE1/AE3, Dako) fue de 1 : 150 después del tratamiento de los preparados con pronasa. La detección del anticuerpo primario se realizó usando una peroxidasa de rábano (sistema LASB de Dako) sistema de detección de fosfatasa alcalina (kit de Vectastain ABC, Vector Laboratories, Grünberg, Alemania). Por lo tanto, el sustrato colorante era diaminobenzidina (color marrón) o fosfatasa neo-fucsina alcalina (color rojo). La dilución de la lectina WGA (Vector Laboratories) fue de 1 : 100. El tratamiento adicional se realizó con el kit Vectastain-ABS. La inmuno-tintura con anticuerpo anti-uroplakin III (disponible en Progen, Heidelberg, Alemania) se realizó a una dilución de 1 : 10 y se desarrolló con el kit LSAB (Dako) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Resultados

5 Cultivos celulares convencionales: se cosecharon cultivos primarios de fibroblastos y células uroteliales de pequeñas biopsias de vejigas urinarias porcinas y humanas (Fig. 2). La tinción de células uroteliales con anticuerpos anti-citoqueratina que reaccionan ampliamente confirma su carácter epitelial. Los fibroblastos se colorearon positivamente con vimentina y no reaccionaron con anticuerpos PAN-citoqueratina. Ambos tipos de células mostraron marcación negativa respecto de α -aktina de la musculatura lisa.

La figura 2 es un registro obtenido mediante microscopía de contraste de fases (10 veces) de células uroteliales porcinas que se cosecharon de la mucosa de vejiga urinaria porcina por medio de micro-disección. En el sistema de cultivo bidimensional, libre de suero, las células mostraron su fenotipo poligonal.

10 El medio de cultivo KGM fuertemente suplementado es conocido como un buen medio para mantener el potencial de proliferación de las células uroteliales in vitro. Sin embargo, su gran cantidad de factores de crecimiento y aditivos puede causar problemas al determinar los factores reguladores con origen de fibroblastos en células uroteliales. Por esto, adicionalmente a este medio (grupo 2) se usó un medio universal (DMEM/FKS) en otros experimentos para determinar mejor las interacciones entre las células uroteliales y la matriz extracelular (grupo 1) y las interacciones
15 entre las células uroteliales, los fibroblastos (FB) y la matriz extracelular (MEC) mediante co-cultivo indirecto (grupo 3) y el ajuste de cultivo del medio condicionado por fibroblastos (FBCM) (grupo 4).

Adhesión de células a las membranas: la adhesión de células fue de 80% en submucosa de vejiga acelular y submucosa del intestino delgado no liofilizada (NLSIS) y 70% en LSIS y 60% en ADM 2 h después de la siembra. Después de 10 h el número final de células en la suspensión revela que no quedaron células restantes en la solución de NLSIS y ABS y quedaron 10 % de células en la solución de LSIS y 20% en la solución de ADM. El cultivo de células uroteliales porcinas humanas con medios no condicionados y sin adición de SBF y factores de crecimiento mostró solamente una mala adhesión de las células ya que éstas murieron en el transcurso de los primeros días (no se muestran datos) y por lo tanto no pudieron tomarse en cuenta después.

Viabilidad de las células: la viabilidad de las células se mantuvo alta (≥ 80 %) durante el período de 28 días en todos los grupos. Después de aplicar tinción doble en cultivos de células uroteliales por parte de las células se manifestó una fluorescencia verde de BCECF-AM metabolizados. Las células uroteliales formadas en la superficie de las membranas sobrevivieron y mantuvieron su viabilidad después de seis horas. Estas formaron capas que confluyen en toda la superficie de las membranas los días 14 y 28. Casi no se detectaron células muertas ($< 5\%$) hasta el día 14 en todos los grupos. En comparación con los grupos de control (grupos 1 y 2) las células uroteliales porcinas y humanas bajo inducción con fibroblastos mostraron un número más alto de células viables lo cual se refleja en una fluorescencia verde más intensa de varias capas (no se muestran los datos). En el grupo 4, menos del 10% de las células estaban muertas el día 28, mientras que en el grupo 3 fue detectable una fracción superior de células muertas en las membranas (20%).

Proliferación de las células: núcleos celulares tinturados con DAPI, mostraron diversas etapas de mitosis sin apoptosis detectable (< 5 %) los días 2 y 14 (Fig. 3) en todos los grupos. Las capas múltiples de los núcleos fueron claramente más ricas en el caso de cultivos con inducción de fibroblastos hasta el día 28 (grupos 3 y 4). Los índices de mitosis en los cultivos se elevaron en 1,7 veces (células porcinas) y 1,3 veces (células humanas) en los grupos 1 y 2 (grupo de control) y en 3,2 veces (células porcinas) y 2,9 veces (células humanas) en los grupos 3 y 4 desde el día 2 hasta 14. En el grupo 4 casi no se detectaron núcleos proliferativos el día 28, mientras que los núcleos en las diferentes etapas de mitosis aún eran detectables en el grupo 3.

La figura 3 muestra una tinción de DAPI (ampliación de 40 veces) de una estructura de vejiga urinaria porcina sobre LSIS. Los núcleos celulares se detectaron mediante inmunofluorescencia indirecta el día 14 después de la siembra. Las capas múltiples de los núcleos celulares son visibles (figura 3A) sobre la membrana. La actividad de mitosis de los núcleos que se dividen de las células cultivadas sobre LSIS se muestra en las figuras 3B y 3C (registro de microscopía de fluorescencia, ampliación de 40 veces).

Análisis histológico, histoquímico e inmunohistoquímico de la estructura: el análisis de cultivos que confluyen mostró células positivas para anticuerpos PAN-citoqueratina. Además, se realizaron tinturas con WGA y anticuerpos anti-uroplakin III en tejido nativo y en estructuras de células uroteliales porcinas y humanas.

Los análisis histológicos mostraron la capacidad de células uroteliales para adherirse en todos los cuatro tipos de membrana, migrar y proliferar. En los grupos 1 y 2 (grupos de control) las células migraron el día 1 desde grupos pequeños a 1 a 2 capas, las cuales cubren de manera creciente toda la superficie de las membranas el día 28 sobre LSIS o 2 a 3 capas sobre NLSIS y ABS (Fig. 4). En otro experimento se cultivaron conjuntamente células endoteliales en membranas, pero los fibroblastos se separaron con ayuda de un suplemento de cultivo Transwell (grupo 3). En la tercera serie de experimentos las células epiteliales se cultivaron sobre las membranas con medios condicionados por fibroblastos (grupo 4). Las células uroteliales, cultivadas en medios que contenían 10% de SBF

(grupo 1) o EGF y otros aditivos estándar (grupo 2), mostraron migración y cobertura de membrana limitadas, peores propiedades de crecimiento, menores tasas de proliferación y menos diferenciación en comparación con los cultivos con inducción de fibroblastos. Éstas también mostraron un envejecimiento paulatino después de cuatro semanas. Ni el suero bovino fetal (SBF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y otros aditivos exógenos indujeron una formación de placas ni una diferenciación terminal de células uroteliales porcinas y humanas (grupos 1 y 2) en las condiciones predeterminadas.

La figura 4 muestra cortes en parafina (ampliación 40 veces) de estructuras de células uroteliales sobre membranas acelulares sin inducción de fibroblastos (figuras 4A, 4B, 4E y 4F: tincura de hematoxilina-eosina; Fig. 4C y Fig. 4D: inmunohistoquímica con PAN-citoqueratina). Las células uroteliales sobre ABS (Fig. 4A), LSIS (Fig. 4C) y ADM (Fig. 4E) formaron una monocapa de células planas el día 1 después de la siembra. Las células continuaron la proliferación y mostraron después de un lapso de 28 días una morfología más bien cúbica sobre ABS (Fig. 4 B), LSIS (Fig. 4D) y ADM (Fig. 4F). Los cultivos se componían el día 28 de dos a tres capas de células sobre ABS (Fig. 4B) y una a dos capas sobre LSIS (Fig. 4D) y ADM (Fig. 4F). La inmuno-tincura del urotelio reconstruido in vitro con PAN-citoqueratina sobre LSIS (Fig. 4C y 4D) confirmó el origen epitelial de las células uroteliales.

Se logró una optimización del medio de cultivo por medio de nutrientes solubles, de modo separado de fibroblastos (grupos 3 y 4). Un cultivo de células uroteliales sobre las matrices con fibroblastos, separados mediante el suplemento de cultivo Transwell, produjo resultados similares con respecto a la morfología de las células uroteliales, la formación de capas y la diferenciación en comparación con los experimentos con FBCM.

Estos dos grupos de experimentos (grupos 3 y 4) mostraron un número elevado de capas de células uroteliales sobre las superficies de membrana en el mismo lapso de tiempo en comparación con los cultivos de células uroteliales sin inducción de fibroblastos (grupos 1 y 2) (Fig. 5). De hecho, las tinturas de hematoxilina y eosina revelaron una migración creciente de células uroteliales desde grupos pequeños a una, dos o tres capas (Fig. 3) en oposición a tres hasta siete (grupo 4) o más (grupo 3) capas celulares (Fig. 6 a 8), que el día 28 cubrían completamente la superficie de la membrana con tamaños de hasta 40 cm².

La figura 5 muestra en ampliación respectiva de 40 veces una comparación histológica de células uroteliales que se adhirieron a la sub-mucosa de vejiga urinaria acelular (ABS) y crecieron allí. Las células se cultivaron sin inducción de fibroblastos (medio no condicionado) (Fig. 5A) y con inducción de fibroblastos (medio condicionado) (Fig. 5B). A una concentración de calcio relativamente baja (0,09 mM) las células cubren la membrana 5 días después de la siembra con 1 a 2 capas en el sistema no condicionado (Fig. 5A), comparado con 2 a 3 capas de las células (Fig. 5B) con inducción de fibroblastos.

Después de la proliferación acelerada mediante inducción de fibroblastos en los grupos 3 y 4 (día 14) las células no alcanzaron la madurez terminal a una alta concentración de calcio (2,5 mM). A fin de inducir la diferenciación terminal, se redujo la concentración de SBF de 5% a 1% después de la fase de proliferación (14 días) en el grupo 4. Esto redujo la concentración de factores mitogénicos mientras que la concentración de otros componentes nutrientes permaneció constante, y por lo tanto reguló el estado proliferativo de las células hacia abajo. En estas condiciones tuvo lugar la completa diferenciación de las células superficiales porcinas y humanas, como en los análisis histológicos, histoquímicos e inmunohistoquímicos mostrados en la figura 6 y la figura 7. Este estado se mantuvo hasta el día 28. La tincura intensiva de las células superficiales en estructuras uroteliales con WGA, adicionalmente a su expresión más fuerte de uroplakin III, el cual es un marcador significativo para la diferenciación urotelial, también muestra la diferenciación terminal de estas células (Fig. 6 y 7).

La figura 6 muestra un análisis histológico (Fig. 6A), histoquímico (Fig. 6C, 6D) e inmunohistoquímico (Fig. 6B, 6E, 6F, 6G) de estructuras de células uroteliales porcinas y humanas sobre ABS (figuras 6A, 6B y 6D) después de la disminución de la concentración de SBF de 5% a 1% en comparación con la vejiga urinaria porcina nativa (Fig. 6C, Fig. 6E). La tincura de hematoxilina-eosina (Fig. 6A) de células uroteliales que se cultivaron sobre ABS, muestra un neo-urotelio recubierto el día 28 después de la siembra. Las células uroteliales cultivadas muestran una reacción fuertemente positiva (coloración marrón oscura con sustrato de color diamino benzidina) con un anticuerpo contra PAN-citoqueratina (Fig. 6B). La tincura con WGA de la estructura de células uroteliales (Fig. 6D) es muy similar al urotelio nativo (Fig. 6C) en el caso de la inducción de fibroblastos. WGA marca de manera preponderante las capas altamente diferenciadas del urotelio nativo (Fig. 6C) (cabeza de flecha) e incluye la capa superficial de la estructura de células uroteliales in vitro (Fig. 6D) (cabeza de flecha). Las células menos diferenciadas no se tinturan (flecha) por medio de WGA. La tincura con anticuerpos anti-uroplakin III (color marrón) en urotelio porcino nativo (Fig. 6E) y las estructuras de células uroteliales porcinas (Fig. 6F) y humanas (Fig. 6G) muestra una fuerte similitud entre sí. Como ya se ha mostrado, la expresión intensa de uroplakin III puede verse exclusivamente en la capa superficial del urotelio nativo (Fig. 6E) como también exclusivamente en las capas superficiales de la estructura de células uroteliales (Fig. 6F y Fig. 6G) (amplificación de 40 veces en las figuras 6A a 6F y amplificación de 10 veces en la figura 6G).

La figura 7 muestra un análisis histológico, histoquímico e inmunohistoquímico de estructuras de células uroteliales sobre LSIS con inducción de fibroblastos el día 28. Después de reducir la concentración de SBF de 5% a 1%, la tincura

de hematoxilina-eosina muestra hasta siete capas de células diferenciadas morfológicamente (Fig. 7A). La tinción positiva de células uroteliales con AE1/AE3 confirma su origen epitelial (Fig. 7B). La tinción con WGA (Fig. 7C) muestra que las células superficiales de la estructura de células uroteliales se tiñen de la manera más intensiva con lectina (flecha) en comparación con las células menos diferenciadas en las capas inferiores (Fig. 7B):
 5 amplificación de 10 veces, amplificación de 40 veces en la figura 7A y la figura 7C).

La reducción en las cantidades de SBF, EGF y BPE en los grupos con medio no condicionado (grupos 1 y 2) condujo a células que no se proliferaban y que paulatinamente morían. En el grupo 3 se mantuvo la concentración de SBF en 5% por 28 días. Las fases de migración y proliferación se mantuvieron, lo cual condujo a la expansión de células por el otro lado de la membrana, formación de capas de células menos polarizadas morfológicamente y débilmente diferenciadas (Fig. 8). A fin de confirmar las diferentes fases de proliferación del neo- urotelio en el grupo
 10 4, la demostración de la actividad de los núcleos celulares por medio de tinción de DAPI mostró, en la mayoría de los casos, núcleos mitóticos en la fase de proliferación del cultivo (día 14, 5% de SBF), mientras que en el urotelio diferenciado terminalmente (día 28, 1% de SBF) se disminuyó significativamente la cantidad de núcleos que se dividían.

La figura 8 muestra un corte en parafina de estructuras de células uroteliales sobre NLSIS. En el sistema de cultivo altamente proliferado se mantuvo constante (5%) la concentración de SBF durante un lapso de tiempo de 28 días bajo inducción de fibroblastos. En este sistema de cultivo las células se mantuvieron proliferativas y mostraron una pérdida de diferenciación. Siguió dividiéndose y migraron al otro lado de la membrana de modo que la NLSIS cubrió con muchas capas de células no polarizadas y por consiguiente mostró la imagen de un urotelio hiperproliferativo (amplificación de 40 veces en la figura 8A, amplificación de 10 veces en la figura 8B).
 15
 20

Evaluación de los resultados

La submucosa del intestino delgado, la matriz dérmica acelular y el SBF apoyaron el crecimiento de células uroteliales, lo cual hizo posibles las interacciones célula/MEC y la generación de 2 a 3 capas de células uroteliales en condiciones de cultivo fuertemente suplementadas (grupos 1 y 2). Tanto ABS como también NLSIS eran casi equivalentes en su capacidad de apoyar la proliferación y diferenciación de urotelio. La pequeña diferencia entre LSIS y las membranas no liofilizadas se debe a la forma liofilizada de LSIS [18]. ADM también mostró una buena proliferación y buena diferenciación de urotelio.
 25

Se ha reportado un medio libre de suero con auxiliares estimulantes de crecimiento es crítico para el crecimiento de células uroteliales en condiciones de cultivo convencionales [19]. La suplementación de factores exógenos o 10 % de SBF en los grupos de control mostró efectos instructivos moderados sobre las células uroteliales cultivadas en las membranas (grupos 1 y 2).
 30

A fin de seguir mejorando las condiciones de cultivo de células uroteliales, se utilizó el efecto inductivo de fibroblastos de la lamina propia sobre células uroteliales, por lo cual éstas se abastecen de factores de crecimiento potenciales (grupos 3 y 4). Esto condujo a la migración de las células uroteliales porcinas y humanas con cubrimiento total de membranas con un tamaño de hasta 40 cm² y una proliferación superior en un lapso de tiempo más corto, sin ninguna transformación neoplásica espontánea. La estimulación fue posible solamente mediante suplementación de 5% de SBF bajo inducción de fibroblastos (grupos 3 y 4) y fue significativamente superior que con medios completados de modo exógeno con 10 % de SBF (grupo 1) o EGF y todos los otros aditivos (grupo 2).
 35

Esto muestra que los medios con componentes de fibroblastos contienen factores de crecimiento activos que son secretados en concentraciones suficientemente altas para compensar la baja concentración de SBF (5%) o la ausencia de EGF, BPE, transferrina, hidrocortisona e insulina, que se adicionaban a los medios de cultivo convencionales altamente suplementados. Estos resultados también muestran que la acción mitogénica y el mecanismo de señal del contenido de MEC de las membranas biológicas y los factores inducidos por fibroblasto son sinérgicos entre sí. Este fenómeno favorable puede usarse en estrategias óptimas con el fin de proliferar urotelio sobre matrices biológicas in vitro. Además, el uso de fibroblastos autólogos (en lugar de capas de nutrientes (feeder layers) xenogénicas, es decir capas celulares xenogénicas que sirven como sustratos de crecimiento en el cultivo celular) minimiza el riesgo de la transferencia de infecciones.
 40
 45

El incremento de la tasa mitótica y la maduración retrasada de células uroteliales se logró en este estudio a una suplementación de 5% de SBF en la primera parte de la técnica uroteliales. Más diferenciación ocurrió después de la reducción de SBF (grupo 4). De hecho, la concentración de SBF inhibió una proliferación retrasada de las células y conectó la fase proliferativa a la fase de diferenciación del urotelio bajo regulación estromal y en ausencia de otros factores de crecimiento adicionados de modo exógeno. La proliferación celular se reguló hacia abajo lo cual hizo posible la diferenciación terminal. Esto puede ser de gran importancia para la funcionalidad del urotelio y la inhibición de la hiperproliferación de células después del implante. Todas las cuatro membranas mostraron las células diferenciadas de modo terminal solamente en la capa superficial de modo que se asemejaban al tejido nativo.
 50
 55

En comparación con los cultivos condicionados de fibroblastos de las células uroteliales sobre gel de colágeno [10,15] se mostró por consiguiente que la asociación de componentes adicionales de complejo de MEC que están contenidos en las membranas y el medio adaptado a pasos mejoró las condiciones de cultivo sobre estas matrices. Efectivamente, los cultivos de células uroteliales no pudieron proliferarse sobre el gen de colágeno en más de tres capas ni lograron una diferenciación terminal con FBCM [10] ni mostraron expresión celular para uroplakin III [15].

Adicional a los cultivos estáticos, el medio de cultivo propuesto en el método (4) puede usarse para cultivos en cámaras de perfusión y biorreactores, si se usan diferentes medios para tipos de células especiales que se cultivan en ambos lados de la membrana. Estudios similares para la inducción de células de músculo de vejiga urinaria serían útiles para la construcción de trasplantes de vejiga urinaria vivos, complejos, con células altamente diferenciadas consistentes en células uroteliales por un lado y células lisas de músculo de vejiga por el otro lado de la membrana. Sin embargo, aquí es importante que las células uroteliales diferenciadas de modo terminal protejan el material de trasplante, es decir la membrana (con o sin células de músculo), contra la orina.

En comparación con las células uroteliales que se cultivaron en medios con aditivos relativamente caros, el método de la invención hace posible la proliferación y la diferenciación terminal de células uroteliales en un lapso de tiempo más breve usando medios que no contienen los suplementos relativamente caros ya mencionados. Este aspecto financiero favorable es un factor interesante que debería tomarse en cuenta al preparar trasplantes de vejiga urinaria.

La acción inductiva de FBCM no se observó solamente en células uroteliales porcinas sino también en células uroteliales humanas (Fig. 6).

La figura 9 muestra una representación esquemática de la estructura de trasplante de tejido 1 según la invención. Sobre la membrana 2 se encuentran siete capas de células uroteliales 3, en cuyo caso la capa exterior 5 es una capa de células uroteliales diferenciadas de modo terminal. Las capas 4 se componen de capas de células uroteliales diferenciadas de modo no terminal.

Las condiciones de cultivo según la invención de las células uroteliales presentan un potencial terapéutico para la inducción de la generación de urotelio a partir de un órgano enfermo.

Conociendo que las propiedades de barrera de las estructuras uroteliales fuertemente diferenciales son las mismas que las del urotelio nativo [20], el método de cultivo de la invención puede ayudar a acercarse al objetivo último de la generación de trasplantes vivos y funcionalmente autólogos con cualidades similares a las de la vejiga nativa.

Para preparar la estructura según la invención y para realizar el método de la invención no se requiere la suplementación de factores de crecimiento caros lo cual representa una ventaja financiera considerable. En comparación con estructuras similares, la estructura de la invención puede obtenerse en un tiempo esencialmente más breve con el método de acuerdo con la invención. Por consiguiente, la duración del tratamiento de un paciente cuya vejiga urinaria tenga que reconstruirse puede abreviarse considerablemente. Impidiendo la utilización de los segmentos gastrointestinales pueden prevenirse complicaciones asociadas y, por consiguiente, ahorrarse otros costes.

Bibliografía

1 Falke G, Caffaratti J, Atala A. Tissue engineering of the bladder [Diseño de tejido de la vejiga]. World J Urol.2000; 18:36-43.

2 Atala A. New methods of bladder augmentation [Nuevos métodos de aumento de la vejiga]. BJU Int 2000; 85:24-34

3 Atala A. Bladder regeneration by tissue engineering [Regeneración de la vejiga mediante diseño de tejido]. BJU Int 2001; 88:765-70

4 Yoo JJ, Meng J, Oberpenning F, Atala A. Bladder augmentation using allogenic bladder submucosa seeded with cells [Aumento de la vejiga usando submucosa de vejiga alogénica sembrada con células]. Urology 1998; 51:221-5

5 Zhang Y, Kropp BP, Moore P, et al. Coculture of bladder urothelial and smooth muscle cells on small intestinal submucosa: potential applications for tissue engineering technology [Co-cultivo de células uroteliales de vejiga y de musculatura lisa sobre submucosa del intestino delgado: aplicaciones potenciales para tecnología de diseño de tejido]. J Urol 2000-, 164: 928-34

6 Cheng EY, Kropp BP. Urologic tissue engineering with smallintestinal submucosa: potential clinical applications [Diseño de tejido urológico con submucosa de intestino delgado: aplicaciones clínicas potenciales]. World J Urol 2000; 18:26-30

- 7 Strehl R, Schumacher K, de Vries U, Minuth WW. Proliferating cells versus differentiated cells in tissue engineering [Células proliferantes versus células diferenciadas en el diseño de tejido]. *Tissue Eng* 2002; 8:37-42
- 8 Voytik-Harbin SL, Rajwa B, Robinson JP. 3D imaging of extracellular matrix and extracellular matrixcell interactions [Creación de imágenes en tres dimensiones de matriz extracelular e interacciones de células de matriz extracelular]. *Methods Cell Biol* 2001; 63:583-97
- 9 Sittinger M, Bujia J, Rotter N, Reitzel D, Minuth WW, Burmester GR. Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques [Diseño de tejido y formación de trasplante autólogo: estrategias prácticas con biomateriales reabsorbibles y nuevas técnicas de cultivo celular]. *Biomaterials* 1996; 17:237-42
- 10 Fujiyama C, Masaki Z, Sugihara H. Reconstruction of the urinary bladder mukosa in three-dimensional collagen gel culture: fibroblast-extracellular matrix interactions on the differentiation of transitional epithelial cells [Reconstrucción de la mucosa de vejiga urinaria en cultivo de gel colágeno tridimensional: interacciones de fibroblastos-matriz extracelular en la diferenciación de células epiteliales transicionales]. *J Urol* 1995; 153:2060-7
- 11 Erdani Kreft M, Sterle M. The effect of lamina propria on the growth and differentiation of urothelial cells in vitro [El efecto de lamina propria en el crecimiento y diferenciación de células uroteliales in vitro]. *Pflugers Arch* 2000; 440(5 Suppl): R181-2
- 12 Scriven SD, Booth C, Thomas DF, Trejdosiewicz LK, Southgate J. Reconstitution of human urothelium from monolayer cultures [Reconstitución de urotelio humano a partir de cultivos monocapa]. *J Urol* 1997; 158: 1147-52
- 13 Staack A, Alexander I, Merguerian P, Terris MK. Organ and species specificity in the stimulation of transitional epithelial cell growth by fibroblasts [Especificidad de órgano y especies en la estimulación del crecimiento celular epitelial transicional por fibroblastos]. *Eur Urol* 2001; 39:471-7
- 14 de Boer WI, Vermeij M, Diez de Medina SG, et al. Functions of fibroblast and transforming growth factors in primary organoid-like cultures of normal human urothelium [Funciones de fibroblasto factores de crecimiento de transformación en cultivos primarios tipo organoide de urotelio humano normal]. *Lab Invest* 1996; 75:147-56
- 15 Ludwikowski B, Zhang YY, Frey P. The long-term culture of porcine urothelial cells and induction of urothelial stratification [El cultivo a largo plazo de células uroteliales porcinas e inducción de estratificación uroteliales]. *BJU Int* 1999; 84:507-14
- 16 Rebel JM, De Boer WI, Thijssen CD, Vermey M, Zwarthoff EC, Van der Kwast TH. An in vitro model of urothelial regeneration: effects of growth factors and extracellular matrix proteins [Un modelo in vitro de regeneración uroteliales: efectos de factores de crecimiento y proteínas de matriz extracelular]. *J Pathol*. 1994; 173:283-91
- 17 Langkilde NC, Wolf H, Orntoft TF. Lectinohistochemistry of human bladder cancer: loss of lectin binding structures in invasive carcinomas [Lectinohistoquímica de cáncer de vejiga humana: pérdida de estructuras enlazantes de lectina en carcinomas invasivos]. *APMIS* 1989;97:367-73.
- 18 Lindberg K, Badilak SF. Porcine small intestinal submucosa (SIS): a bioscaffold supporting in vitro primary human epidermal cell differentiation and synthesis of basement membrane proteins [Submucosa de intestino delgado porcino (SIS): un bioandamio que soporta diferenciación celular epidérmica humana primaria in vitro y síntesis de proteínas de membrana de fundamento]. *Burns* 2001; 27:254-66
- 19 Hutton KAR, Trejdosiewicz LK, Thomas DFM, Southgate J: Urothelial tissue culture for bladder reconstruction: an experimental study [Cultivo de tejido urotelial para reconstrucción de vejiga: un estudio experimental]. *J Urol* 1993; 150:721-25
- 20 Sugasi S, Leshros Y, Bisson I, Zhang YY, Pavel K, Frey P: in vitro engineering of human stratified urothelium: analysis of its morphology and function [Diseño in vitro de urotelio humano estratificado: análisis de su morfología y función]. *J Urol* 2000: 164-.951-57.

REIVINDICACIONES

1. Estructura de trasplante de tejido para la reconstrucción de una vejiga urinaria humana o animal la cual comprende
- (a) una membrana biológicamente compatible que contiene colágeno; y
- 5 (b) una o varias capas sobre la membrana de células tisulares específicas del órgano,
- en cuyo caso la capa externa de las células tisulares específicas de órgano es una capa de células tisulares específicas de órgano diferenciadas de modo terminal y las células tisulares específicas de órgano son células uroteliales.
- 10 2. Estructura de trasplante de tejido según la reivindicación 1, caracterizada porque las células tisulares son de origen humano o porcino.
3. Estructura de trasplante de tejido según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque las células tisulares son de origen autólogo.
4. Estructura de trasplante de tejido según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque la membrana biológicamente compatible que contiene colágeno es un tejido de submucosa o dérmico.
- 15 5. Estructura de trasplante de tejido según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque la membrana biológicamente compatible que contiene colágeno es una submucosa intestinal, una submucosa de vejiga urinaria acelular o una matriz dérmica acelular.
6. Estructura de trasplante de tejido según una de las reivindicaciones precedentes, obtenida
- (a) aplicando células tisulares sobre la membrana biológicamente compatible que contiene colágeno;
- 20 (b) mediante proliferación de las células tisulares aplicadas mediante opción estromal en un medio de cultivo con formación de una o varias capas de células uroteliales sobre la membrana;
- y
- (c) diferenciación terminal de la capa externa de las células tisulares expandidas bajo inducción estromal adicional disminuyendo factores mitogénicos en el medio de cultivo.
- 25 7. Método para la preparación de una estructura de trasplante de tejido para la reconstrucción de una vejiga urinaria humana o animal que comprende los pasos de
- (a) aplicar células tisulares específicas de órgano sobre una membrana biológicamente compatible que contiene colágeno;
- 30 (b) hacer proliferar las células tisulares aplicadas mediante inducción estromal en un medio de cultivo con la formación de una o varias capas de células tisulares sobre la membrana;
- y
- (c) diferenciación terminal de al menos la capa externa de las células tisulares expandidas bajo inducción estromal adicional disminuyendo factores mitogénicos en el medio de cultivo;
- en cuyo caso las células tisulares específicas de órgano son células uroteliales.
- 35 8. Método según la reivindicación 7, que comprende los pasos de
- (a) aplicación de células uroteliales sobre una membrana biológicamente compatible que contiene colágeno;
- (b) proliferación de las células uroteliales aplicadas por medio de inducción estromal en un medio de cultivo con la formación de una o varias capas de células uroteliales sobre la membrana;
- y

(c) diferenciación terminal de al menos la capa exterior de las células uroteliales expandidas bajo inducción estromal adicional disminuyendo factores mitogénica se en el medio de cultivo.

5 9. Método según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, caracterizada porque las células tisulares aplicadas sobre la membrana en el paso (a) para la proliferación y diferenciación terminal se cultivan en un medio de cultivo que contiene suero bovino fetal (SBF) o suero autólogo.

10. Método según una de las reivindicaciones 7 a 9, caracterizada porque las células tisulares aplicadas sobre la membrana en el paso (a) para la proliferación y diferenciación terminal se cultivan en un medio condicionado de fibroblastos (FBCM), que contiene suero bovino fetal (SBF) o suero autólogo.

11. Método según la reivindicación 7, caracterizado porque comprende los pasos de

10 (a) aplicación de células uroteliales autólogas sobre una membrana biológicamente compatible que contiene colágeno;

(b) proliferación de células uroteliales aplicadas en un medio condicionado de fibroblastos (FBCM), el cual contiene suero bovino fetal (SBF), se forman hasta cuatro a siete capas de células uroteliales sobre la membrana; y

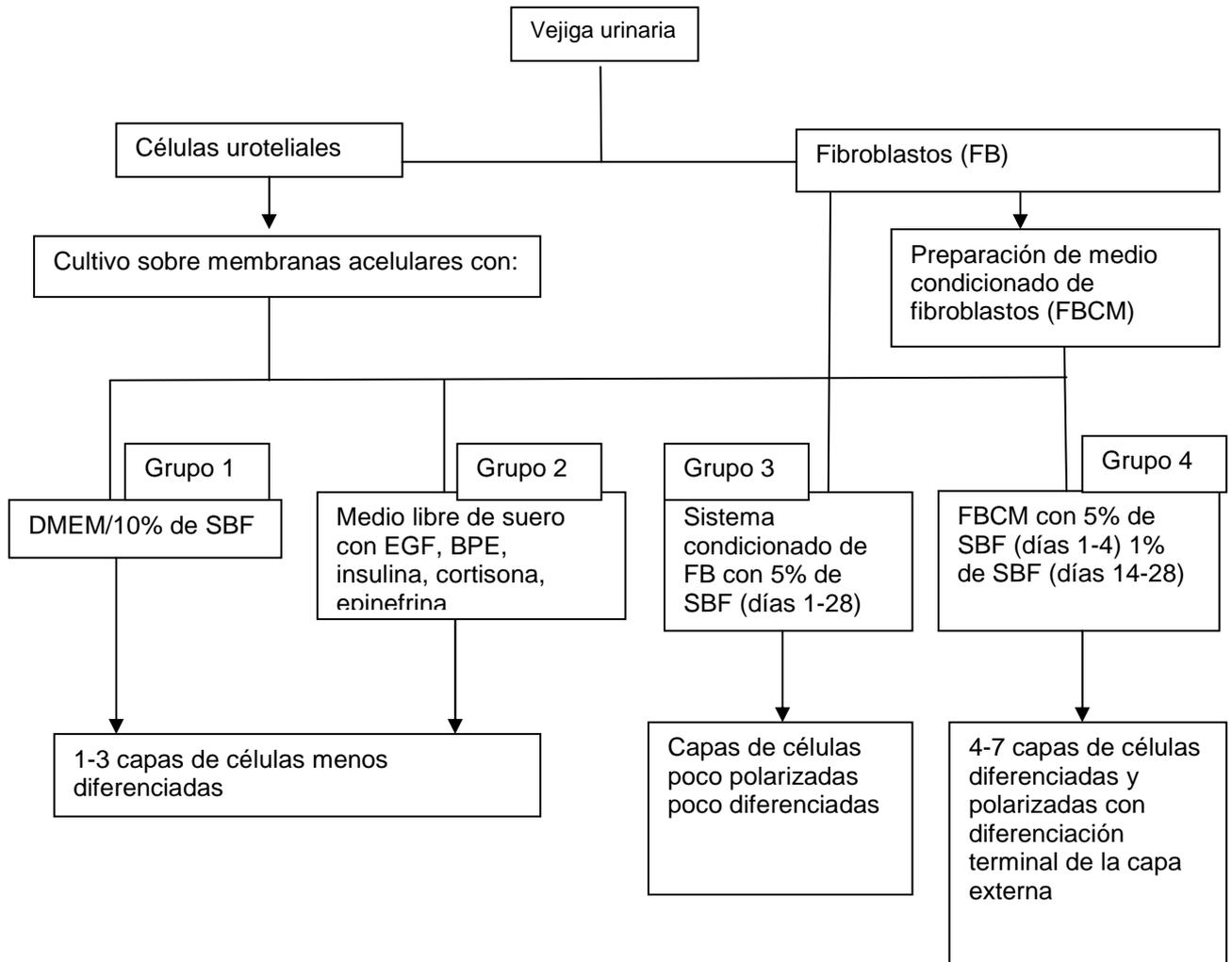
15 (c) diferenciación terminal de las células uroteliales expandidas de la capa externa disminuyendo la concentración de SBF.

12. Uso del método según una de las reivindicaciones 7 a 11 para la preparación de una estructura de trasplante de tejido para la reconstrucción de una vejiga urinaria humana o animal.

13. Uso según la reivindicación 12 para la preparación de una estructura de trasplante de tejido según una de las reivindicaciones 1 a 6.

20

Fig. 1



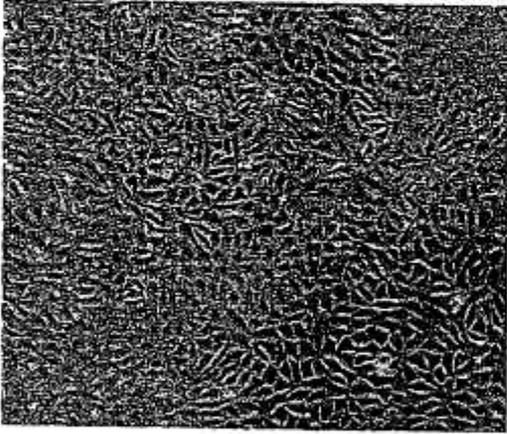


Fig. 2

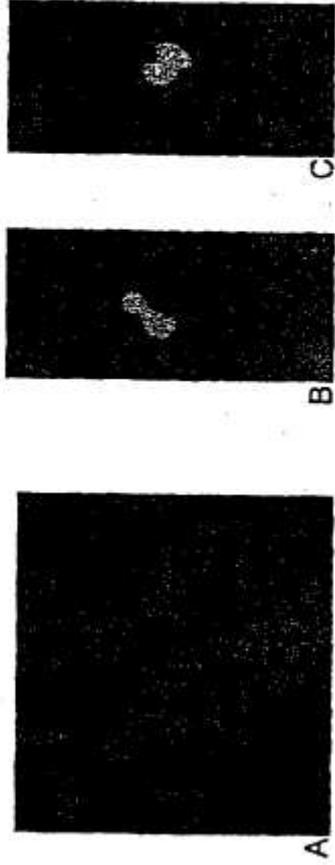


Fig. 3

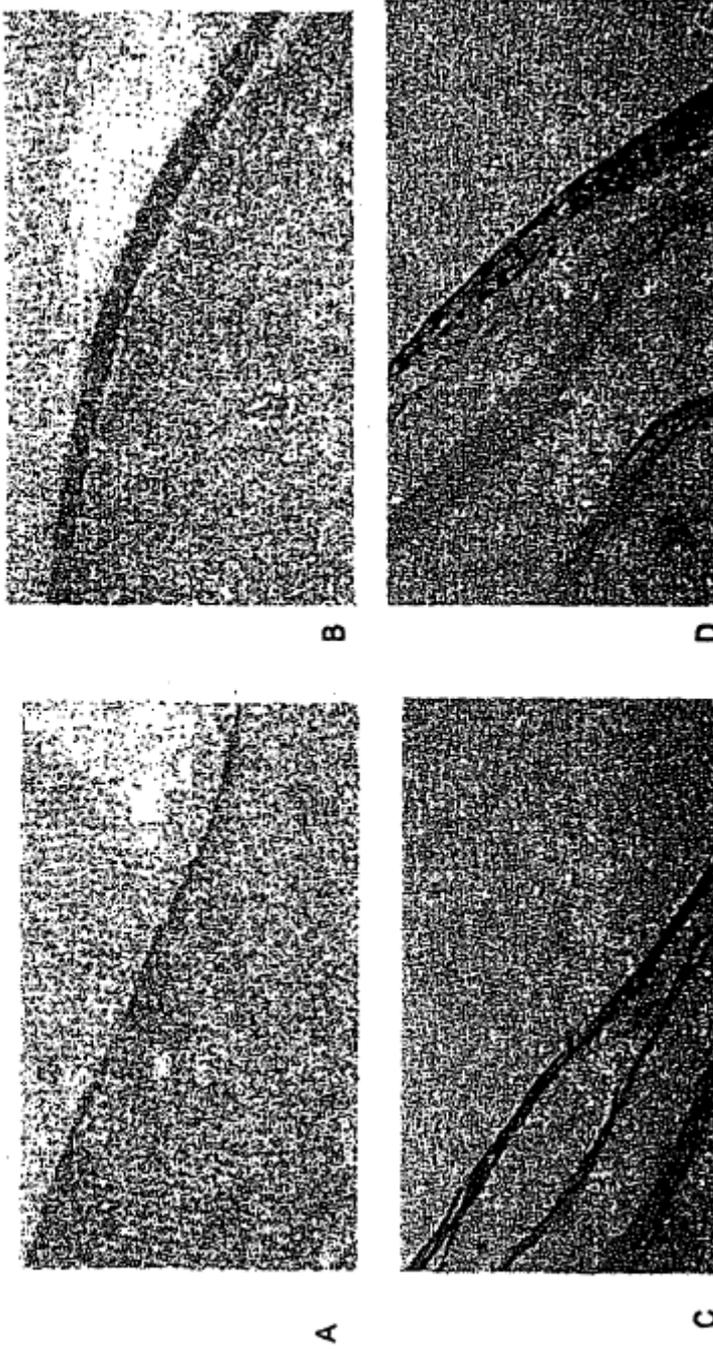


Fig.4

Fig. 4 (Continuación)





A



B

Fig.5

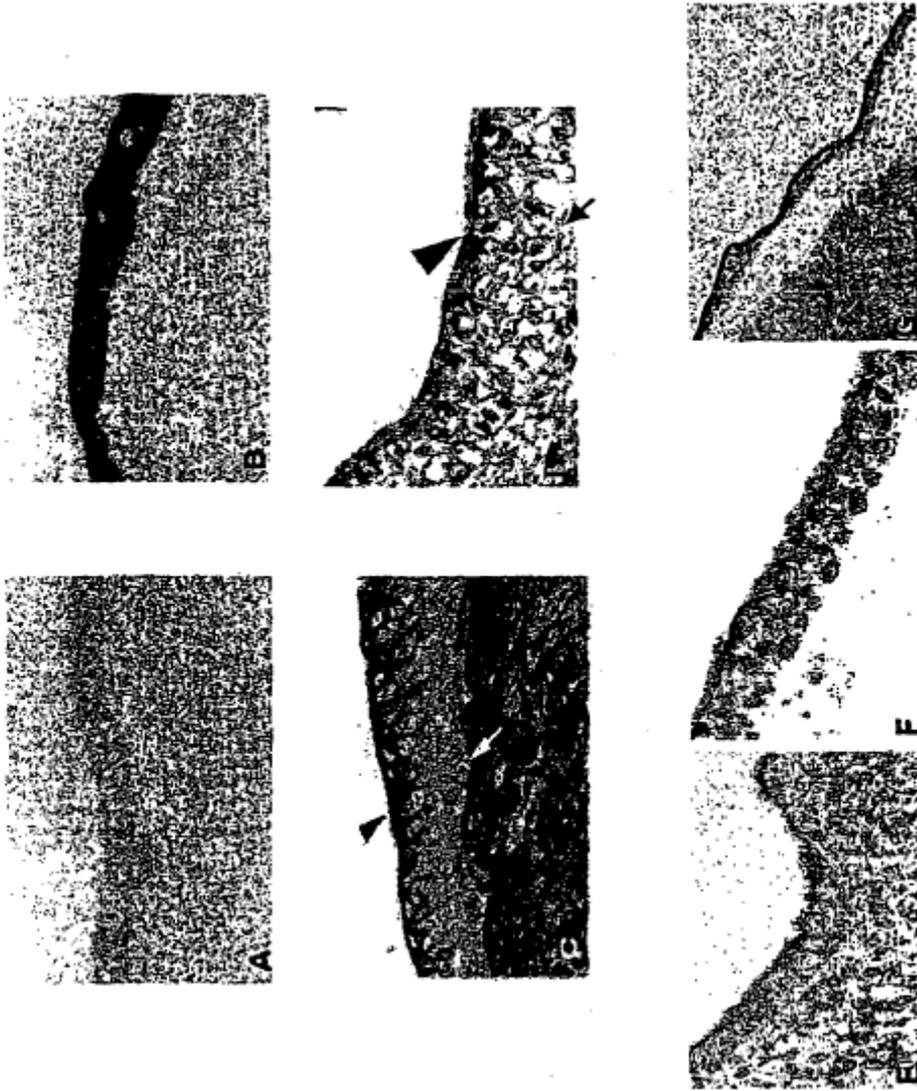
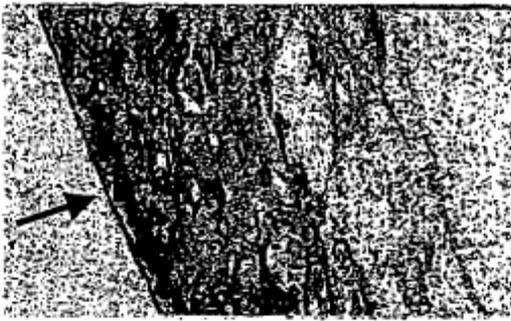


Fig. 6



C



B



A

Fig.7



B



A

Fig.8

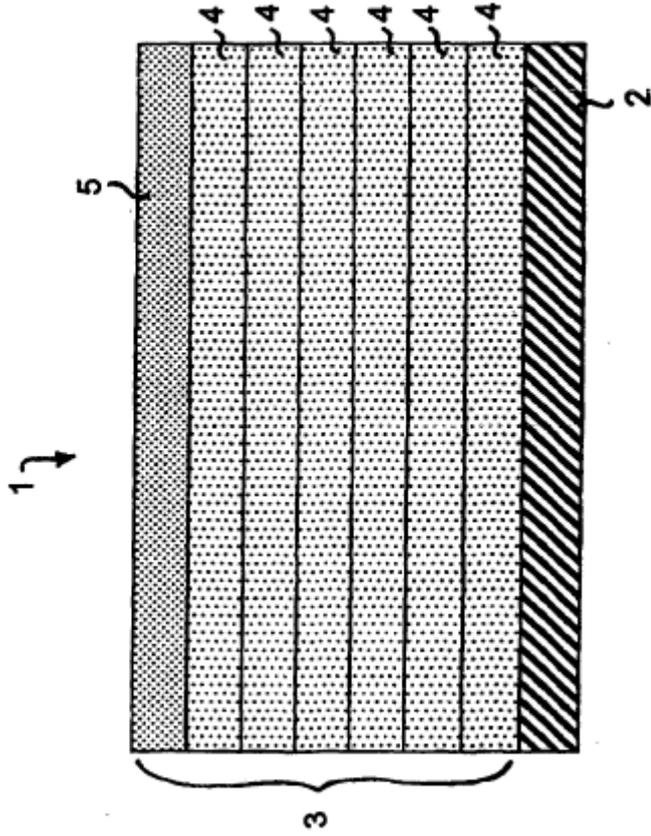


Fig. 9