

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 471 367**

51 Int. Cl.:

A61L 27/16 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01)

A61L 27/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2010 E 10305851 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2014 EP 2422823**

54 Título: **Implante bioactivo**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.06.2014

73 Titular/es:

**INSTITUT QUIMIC DE SARRIA (25.0%)
C/ Via Augusta 384-394
08017 Barcelona, ES;
UNIVERSIDAD POLITECNICA DE VALENCIA
(25.0%);
FUNDACIO INSTITUT D'INVESTIGACIO
SANITARIA GERMANS TRIAS I PUJOL (25.0%) y
ASSOCIATION CARDIO-MONDE (25.0%)**

72 Inventor/es:

**CHACHQUES, JUAN CARLOS;
BAYES GENIS, ANTONIO;
MONLEÓN PRADAS, MANUEL;
SEMINO, CARLOS EDUARDO;
ZUR NIEDEN, NICOLE y
JENNY, PHILIPPE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 471 367 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

Implante bioactivo

5 La presente invención se refiere generalmente al campo de la reparación miocárdica, más particularmente a un método y a un implante bioactivo para reparar el miocardio y sostener la configuración y función de la cámara ventricular.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La insuficiencia cardíaca (HF) es una afección de las personas ancianas, y de este modo el “envejecimiento de la población” ampliamente reconocido contribuye a incrementar la incidencia de HF. La incidencia de HF se aproxima al 10 por 1000 de la población después de los 65 años de edad, y aproximadamente el 80% de los pacientes hospitalizados con HF tienen más de 65 años de edad.

La insuficiencia cardíaca es un problema de salud pública importante y en crecimiento en los países desarrollados. En los Estados Unidos de América, aproximadamente 7 millones de pacientes tienen HF, y más de 550000 pacientes son diagnosticados con HF por primera vez cada año. El trastorno es la razón principal para 12 a 15 millones de visitas a los consultorios, y 6,5 millones de días hospitalarios cada año.

15 La insuficiencia cardíaca es el grupo más habitual relacionado con el diagnóstico del seguro médico para personas mayores (es decir, diagnóstico de alta hospitalaria), y se gastan más dólares del seguro médico para personas mayores para el diagnóstico y tratamiento de HF que para cualquier otro diagnóstico.

En Europa, la epidemiología no es bien conocida; se estima que alrededor de 30 millones de pacientes sufren insuficiencia cardíaca.

20 El trasplante de células y la manipulación tisular mediante ingeniería al corazón enfermo surgen como estrategias prometedoras para prevenir o tratar insuficiencia cardíaca resistente al tratamiento que no se puede tratar satisfactoriamente mediante terapias convencionales. Los avances en biología celular, en manipulación biológica mediante ingeniería, y las nanotecnologías dan avances adicionales en esta opción. La implantación de células exógenas sostenidas por armazones en el tejido cicatrizal miocárdico para sustituir las células dañadas o inhábiles es un enfoque terapéutico seguro y eficiente.

Nicho beneficioso para las células madre y migración e implantación celular

Tras el infarto de miocardio, los cambios no sólo afectan al elemento contráctil del miocardio (cardiomiocitos) sino también a la matriz extracelular. El porcentaje de colágeno tipo I disminuye de 80% a 40%, y este colágeno es responsable con los otros elementos del músculo cardíaco de la geometría ventricular normal.

30 La eficiencia de la terapia celular para aumentar la recuperación tras isquemia miocárdica depende del reclutamiento suficiente de células aplicadas al tejido diana. La migración e implantación en sitios de neovascularización activa es un proceso complejo que depende de la interacción orquestada en el tiempo y en el espacio entre quimiocinas (por ejemplo SDF-1), receptores de quimiocinas, señalización intracelular, moléculas de adhesión (selectinas e integrinas) y proteasas.

35 Hasta ahora, el trasplante celular para el sostén y regeneración cardíacos estaba limitado a efectos pobres en la función ventricular. Esto puede ser debido a la falta de uniones de salto entre el miocardio nativo y las células injertadas. También, el trasplante celular parece estar limitado por la relocalización de células transplantadas para eliminar órganos y miocardio no infartado, y por la muerte de células transplantadas. La mayoría de la muerte celular se produce en los primeros pocos días tras el trasplante, probablemente de una combinación de isquemia, apoptosis e inflamación. La apoptosis puede ser inducida por células dependientes del anclaje que se despegan de la matriz extracelular circundante.

40 El nicho beneficioso celular, un entorno especializado que rodea las células madre, proporciona un sostén crucial necesario para el mantenimiento de la célula. La función del nicho beneficioso comprometida puede conducir a la selección de células madre que ya no dependen de factores autorrenovables producidos por su entorno. Se han desarrollado estrategias para mejorar la supervivencia y diferenciación celulares, tales como la manipulación de tejidos mediante ingeniería genética.

Manipulación de tejidos cardíacos mediante ingeniería

50 La remodelación de la matriz extracelular en insuficiencia cardíaca (degradación excesiva de la matriz y fibrosis miocárdica) contribuye a la dilatación del LV y a la disfunción cardíaca progresiva. La manipulación del tejido miocárdico mediante ingeniería debería proporcionar soporte estructural al corazón, armazones específicos deberían ayudar a normalizar el esfuerzo de la pared cardíaca en regiones lesionadas, mejorando la distribución de la tensión. Los materiales de la manipulación mediante ingeniería que requieren propiedades específicas de rigidez y resistencia a la deformación se pueden implantar o sembrar en el tejido miocárdico. Están compuestos de una estructura natural o sintética capaz de soportar formación de tejido tridimensional. La supervivencia e injerto de

células en el entorno del miocardio isquémico representa un reto para todos los tipos de células, independientemente de su estado de diferenciación. Las características de los armazones son críticas para recapitular el medio in vivo y permitir a las células que influyan sobre sus propios microentornos. Tales armazones sirven para al menos uno de los siguientes fines: permiten la unión y migración de las células, el suministro y retención de células y factores bioquímicos, permiten la difusión de nutrientes celulares vitales y productos expresados, y ejercen ciertas influencias mecánicas y biológicas para modificar el comportamiento de la fase celular. Además, el desarrollo de uniones de salto dentro del nuevo tejido creado, así como con el tejido miocárdico hospedante, son de gran interés funcional.

Terapias de restricción ventricular

Los pacientes con insuficiencia cardíaca desarrollan corazones sobredimensionados, dilatados, debido a mayores presiones de llenado. Con el tiempo, la carga de trabajo mayor del corazón puede conducir a un cambio denominado remodelación, que es el agrandamiento y adelgazamiento de los ventrículos. El músculo cardíaco que falla necesita ser sostenido para disminuir el esfuerzo de la pared ventricular. Se han usado dispositivos de envoltura de malla, que se implantan alrededor del corazón. Estos dispositivos están destinados a prevenir o invertir la progresión de la insuficiencia cardíaca al mejorar la estructura y función del corazón, conduciendo a mejoras en la supervivencia y calidad de la vida del paciente. Por ejemplo, se han ensayado dispositivos implantables para la terapia de restricción ventricular, como un saco en forma de malla de poliéster diseñado para la colocación alrededor del corazón, fabricado en un tricotado de malla de múltiples filamentos (dispositivo CorCap, Acorn). También se investigó una malla de nitinol para la envoltura ventricular (dispositivo HeartNet, Paracor). La experiencia de implantación permanente de ambos dispositivos mostró efectos adversos como la restricción en la función diastólica y a falta de mejora de la función sistólica, sin signos de curación miocárdica. Estos resultados han limitado su gran aplicación clínica, incluyendo la decisión de la U.S. Food and Drug Administration (FDA) de “no aprobarlos”.

Investigación traduccional

Se han llevado a cabo estudios experimentales y clínicos sobre terapia de células madre y enfoques de manipulación de tejidos mediante ingeniería para el sostén y regeneración miocárdicos. Los resultados de estas investigaciones tienden a demostrar el interés de la terapia de células madre intrainfarto simultánea con la fijación de matrices sembradas de células en el epicardio de ventrículos infartados.

El documento WO2006/036826 describe un almacén para sustituir porciones del músculo cardíaco, que comprende un almacén microporoso que comprende un material biocompatible y un hidrogel nanofibroso formado por péptidos autoensambladores. El almacén microporoso puede consistir en un polímero biodegradable o en un polímero no degradable. Los poros del almacén microporoso están llenos del hidrogel. El almacén puede comprender además marcadores radioopacos, células, factores de crecimiento, y otros compuestos bioactivos.

Los estudios experimentales sugieren que la inyección intramiocárdica autóloga simultánea de células madre y la fijación de una matriz de colágeno sembrada de células sobre el epicardio es factible. Sin embargo, la eficacia a largo plazo de este enfoque se ve comprometida por la biodegradación completa de la matriz de colágeno injertada.

En resumen, se encontraron los siguientes problemas en el campo de la reparación miocárdica.

- 1) Es difícil de reparar una gran cicatriz miocárdica.
- 2) La biorretención celular y el injerto en el tejido cicatrizal es demasiado baja.
- 3) La mortalidad de las células implantadas en el miocardio isquémico es elevada.
- 4) La remodelación de la matriz extracelular en cardiopatía isquémica (degradación excesiva de la matriz y fibrosis miocárdica) contribuye a la dilatación del LV y a la disfunción cardíaca progresiva.
- 5) La limitación terapéutica de la dilatación cardíaca y la recuperación de la forma elíptica nativa de las cámaras ventriculares son factores de pronóstico claves para la supervivencia en pacientes con HF.
- 6) En el trasplante celular, la supervivencia y el injerto en el entorno del miocardio isquémico representa un reto para todos los tipos de células, independientemente de su estado de diferenciación.
- 7) Hasta ahora, la combinación óptima célula-matriz para la restauración robusta y sostenida del miocardio no se ha identificado.
- 8) La eficacia a largo plazo del enfoque – inyección intramiocárdica autóloga de células madre y fijación de una matriz de colágeno sembrada con células en el epicardio – se ve comprometida por la biodegradación completa de la matriz de colágeno injertada.
- 9) Hay efectos indeseados de la administración de factores de crecimiento.
- 10) Viabilidad/evolución tisular con el tiempo.

SUMARIO DE LA INVENCION

5 La presente invención proporciona un implante bioactivo para reparar el miocardio y sostener la configuración y función de la cámara ventricular, y un método para preparar tal implante. El implante bioactivo se injerta sobre y/o en la pared ventricular para la regeneración miocárdica, para el sostén ventricular izquierdo o derecho, y para restaurar la forma elíptica de las cámaras ventriculares.

Los armazones se crean mediante la combinación de materiales biodegradables (biológicos o sintéticos) con materiales sintéticos no biodegradables (bioestables). Durante el procedimiento, se pueden sembrar células, por ejemplo células madre, en esta forma de molde, e inmediatamente o posteriormente se pueden injertar en el tejido miocárdico enfermo.

10 El método de la invención comprende las etapas de crear un armazón combinando materiales biodegradables con materiales no biodegradables, obtener células autólogas o células de un donante, implantar las células en la matriz, e injertar los armazones celulares compuestos en el corazón.

15 El implante y método de la presente invención procura mejorar la función ventricular, limitar la dilatación crónica de las cámaras ventriculares, y restaurar la forma elíptica nativa del corazón como una nueva modalidad en el tratamiento de insuficiencia cardíaca.

Las ventajas de los objetos de la presente invención son las siguientes:

a) El trasplante de células madre induce angiogénesis y/o miogénesis miocárdica, mejorando la viabilidad miocárdica y reduciendo la fibrosis cicatrizal.

20 b) El injerto de armazones de la matriz mejora el nicho de las células madre y la migración e implantación celular, incrementando consiguientemente el grosor de la cicatriz del infarto con tejidos viables. Este material compuesto ayuda a normalizar el esfuerzo de la pared cardíaca en regiones lesionadas. Además, la formación de nuevos vasos desde el epicardio y desde el miocardio bien irrigado circundante contribuye a la reducción de la fibrosis y al tamaño de las cicatrices del infarto, induciendo la regeneración de células que se contraen y de la matriz de colágeno extracelular.

25 c) El material de soporte cardíaco sintético sobre el corazón proporciona un impacto beneficioso a largo plazo sobre el tamaño y forma de la cámara ventricular, reduciendo tensión y promoviendo la limitación de la remodelación adversa. Además, este material ayuda a normalizar el esfuerzo de la pared cardíaca en regiones lesionadas, mejorando la distribución de la tensión, evitando discinesia cicatrizal, y el riesgo de formación de aneurismas ventriculares, ruptura de la pared ventricular e insuficiencia de la válvula mitral.

30 d) Envoltura ventricular adaptada. Los implantes bioactivos de la presente invención están diseñados para el sostén y regeneración ventricular izquierdo y/o ventricular derecho, incluyendo diferentes tamaños para envolturas ventriculares parciales o completas. Las características del implante (mecánicas, físicas, químicas, biológicas) se adaptan para la geometría, fisiología y patología del ventrículo izquierdo o del derecho.

35 e) Mantenimiento y supervivencia de las células implantadas in situ. La preparación y mantenimiento de la población celular de los implantes bioactivos se obtiene mediante terapia celular cardíaca antes, durante o después de injertar "implantes bioactivos" en el corazón. El trasplante celular se lleva a cabo usando enfoques a base de catéter vía el endocardio (endoventricular), vía un procedimiento intravascular (a través de las arterias o venas coronarias), o inyectando las células a través del epicardio durante cirugía cardiotorácica, toracoscopia o procedimientos asistidos por computador-robótica. Adicionalmente, se usa una tensión reducida de oxígeno (por ejemplo, 5% a 15%) durante el crecimiento celular como un procedimiento de preacondicionamiento para mejorar la supervivencia mejorar tras el implante del parche en miocardio isquémico.

40 f) Prevención de la dilatación del LV y disfunción cardíaca progresiva. Según un aspecto de la invención, todo el órgano está contenido con la membrana elastomérica del implante bioactivo para evitar la dilatación cardíaca. De este modo, con una menor tensión de la pared ventricular, el tratamiento complementario de injertar tejido biológico (por ejemplo péptidos y células madre) puede lograr con éxito la regeneración miocárdica. Adicionalmente, se pueden usar electrodos de estimulación en el método de la invención, y también se pueden incorporar en los implantes bioactivos y el miocardio nativo para la electroestimulación simultánea del tejido implantado, y otros tratamientos electrofisiológicos (desfibrilación, resincronización, etc.).

45 g) Tratamiento regenerativo en asociación con implantes en vista de la supervivencia e injerto. Los tratamientos regenerativos miocárdicos a base de células pueden estar asociados, es decir, trasplante de células madre intramiocárdicas e intrainfarto, con el implante de implantes bioactivos en el corazón. Método asociado para sembrar o implantar células madre en o sobre los implantes bioactivos usando los siguientes métodos: mecánico (agitación, centrifugación), químico (electroforesis), físico (electroporación), etc. Células sembradas o implantadas que pueden ser angiogénicas, cardiomiogénicas o pluripotentes. Adicionalmente, los implantes bioactivos se pueden marcar con productos (colorantes, microesferas, radioisótopos, partículas

de hierro, etc.) para la evaluación de la biodegradación, integración, proliferación, diferenciación y función, usando métodos radiológicos, de ultrasonidos-ecocardiográficos, radioisotópicos, metabólicos (PET), RMI, barrido de CT y de bioluminiscencia-fluorescencia (etc.).

5 h) Composición ajustada de los implantes bioactivos. La composición de los implantes bioactivos tiene un porcentaje de componentes no biodegradables (sintéticos) frente a componentes biodegradables (biológicos o sintéticos), que oscila de 10% a 90%.

10 i) Para obviar el efecto sistémico indeseado de factores de crecimiento, el material sintético se diseña para liberar localmente factores angiogénicos tales como VEGF, HBEGF, bFGF. Adicionalmente, según una realización de la presente invención, los implantes bioactivos están dotados con un sistema para la liberación controlada de factores angiogénicos y antiapoptóticos.

j) Evaluación del crecimiento tisular y viabilidad. Se incorporan electrodos sensores en los implantes bioactivos y se conectan a un dispositivo de medida de la impedancia bioeléctrica. El objeto de este monitor implantable es evaluar mediante telemetría la evolución del tejido manipulado mediante ingeniería en la regeneración cardíaca, y detectar edema pulmonar prematuro en pacientes con insuficiencia cardíaca.

15 DEFINICIONES

Una membrana es un material que tiene una de sus tres dimensiones (su grosor) mucho más pequeño que sus otras dos dimensiones (su longitud y anchura), siendo estas últimas comparables en magnitud. Un elastómero es un material macromolecular reticulado que, en las condiciones de trabajo, está por encima de su temperatura de transición vítrea, y de este modo es capaz de recuperar fácilmente sus dimensiones no estresadas originales tras el cese de la carga mecánica que no exceda un valor crítico. Una membrana elastomérica es una membrana hecha de un elastómero. Un gel, o hidrogel, es, para los fines del presente documento, un material macromolecular, mediante el cual las interacciones de reticulación física o química producen un componente a base de macromoléculas, capaz de retener grandes cantidades de moléculas de agua. Una membrana elastomérica microporosa es una membrana elastomérica en la que el elastómero configura un sistema de espacios vacíos interconectados, los poros, por todo el grueso de la membrana, teniendo los poros dimensiones lineales en el intervalo de varias decenas a unos pocos cientos de micrómetros. Dichas células hospedantes de los poros, y la matriz extracelular producida por ellos, configurando un entorno tridimensional capaz de transportar estímulos mecánicos a las células y para facilitar interacciones célula a célula tridimensionales. Los poros de la membrana elastomérica microporosa también pueden estar llenos de un gel. Un polímero es una macromolécula que consiste en la repetición de unas pocas unidades diferentes (si una, un homopolímero; si más de una, un copolímero). Un polímero sintético es un polímero no presente de forma natural en el sistema biológico. Un polímero bioestable o no degradable es un polímero que permanece químicamente inalterado in vivo. Un polímero sintético degradable es un polímero sintético que sufre in vivo reacciones de despolimerización (escisión), cuyos productos pueden ser tóxicos o no tóxicos, que pueden ser metabolizados o no metabolizados por los tejidos u órganos del hospedante. Un polímero parcialmente degradable es un polímero compuesto de fragmentos de moléculas bioestables y biodegradables. Un péptido autoensamblador es una clase de péptidos con propiedades autocomplementarias capaces de sufrir espontáneamente una transición de fase desde un estado de sol desordenado hasta un estado más ordenado, en el que el estado ordenado final consiste en estructuras semejantes a cristales o un material amorfo colapsado. Dicha transición es accionada por parámetros medioambientales tales como el umbral de pH o pK, la temperatura, etc. Un gel de péptido autoensamblador es el ensamblaje espontáneo de péptidos autocomplementarios que se desarrollan en cadena o dominios ordenados con formas y dimensiones alargados en el intervalo de unos pocos a decenas de nanómetros, y de este modo se denomina nanofibras.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

45 La presente invención proporciona un implante bioactivo para la regeneración miocárdica y el sostén cardíaco. El implante comprende I. una membrana (parche) de armazón microporosa elastomérica que comprende al menos un polímero sintético no degradable (a), un polímero sintético parcialmente degradable (b) y biomateriales de dimensiones de fibras nanoporosas o de nanoescala, y II. un hidrogel de nanofibra de péptido. La porosidad de dicha membrana está comprendida entre 70% y 90%, estando dichos poros interconectados, y teniendo diámetros preferidos comprendidos entre 80 micrómetros y 150 micrómetros.

50 Más específicamente, el polímero sintético no degradable o bioestable (a) se selecciona del grupo que consiste en polietilacrilato o polietilacrilato copolimerizado con un comonomero de hidroxietilacrilato del 10% en peso o 20% en peso. Este polímero se produce ventajosamente mediante el método de lixiviación del molde, usando como molde una disposición de esferas sinterizadas y/o tejidos de fibras. El polímero sintético parcialmente degradable (b) se selecciona del grupo que consiste en éster 2-(metacrililoiloxi)etílico de caprolactona o éster 2-(metacrililoiloxi)etílico de caprolactona copolimerizado con etilacrilato, en proporciones en peso de este último comonomero comprendidas entre 30 y 80%. Este polímero se produce ventajosamente mediante el método de lixiviación del molde, usando como molde una disposición de esferas sinterizadas y/o tejidos de fibras. El porcentaje de polímeros no degradables frente a polímeros degradables está comprendido entre 10 y 90% en peso; preferiblemente está comprendido entre 10 y 48% en peso.

- 5 En una realización preferida, el hidrogel de nanofibra puede ser degradable, biológica o químicamente, o no degradable, e incluye ventajosamente moléculas naturales matrices derivadas de tales como proteína, péptido, oligosacárido, polisacárido, o proteoglicano tales como colágenos, fibrinas, alginatos, quitosanos, ácido hialurónico, y/o cualquier molécula sintética que se desarrollará en una red de nanofibras con propiedades de gel/hidrogel, tal como un almacén de hidrogel de nanofibras peptídico; una clase de péptidos anfífilos autocomplementarios autoensambladores en nanofibras ilustra tales péptidos. El siguiente péptido AcN-RADARADARADARADA-COONH₂ comercialmente disponible es un ejemplo de esta clase de péptidos.
- 10 En una realización preferida, el gel/hidrogel de fibras nanoporoso o de nanoescala llena completamente los poros de la membrana elastomérica, llena parcialmente los poros formando un recubrimiento de capa para las superficies internas de los poros de la membrana.
- En un aspecto específico de la invención, el polímero sintético bioestable no degradable se trata en la superficie para injertar moléculas de adhesión tales como péptidos funcionales como péptidos RGD (Arg-Gly-Asp), azúcares o lípidos funcionales, y proteínas tales como laminina o fragmentos de laminina.
- 15 El implante bioactivo de la invención se diseña para presentar propiedades mecánicas para que sean suficientemente elásticas para corresponderse a la actividad de contracción/distensión del miocardio para permitir una biointegración estructural y funcional profunda.
- El implante de la invención tiene una membrana elastomérica que contiene todo el órgano, para prevenir la dilatación cardíaca (es decir, una menor tensión de la pared ventricular).
- 20 El implante bioactivo en un aspecto particular de la invención comprende adicionalmente un sistema para la liberación o absorción controlada de moléculas activas tales como cualquier molécula orgánica (pequeña molécula, péptido, lípido, azúcar, proteína, proteoglicano) con actividad angiogénica, antiangiogénica, prorregerativa, antirregerativa, apoptótica, necrótica, antiapoptótica y antinecrótica, tal como VEGF, IL-6, IL-10, IGF-1, FGF-2.
- El sistema de liberación o absorción puede consistir en:
- 25 (a) la molécula encapsulada en micropartículas degradables hechas de polímeros tales como quitosano, ácido hialurónico, complejos de estos dos últimos polímeros, o un poliéster degradable, tal como poliácido glicólico, poliácido láctico, o policaprolactona; llenando o recubriendo dichas micropartículas embebidas en el gel los poros de la membrana;
- 30 (b) la molécula incluida en el gel que llena o recubre los poros de la membrana asociados específica o no específicamente con la estructura del material de llenado de gel;
- (c) la molécula enlazada covalentemente o no covalentemente al péptido autoensamblador que llena o recubre los poros de la membrana;
- (d) la molécula con capacidad de absorción para eliminar cualquier molécula orgánica con actividad antiangiogénica, antirregerativa, apoptótica, necrótica.
- 35 En otro aspecto, el implante bioactivo de la invención, comprende adicionalmente citocinas y péptidos antiapoptóticos angiogénicos.
- Tiene capacidad de unión de componentes segregados por el tejido necrótico. En consecuencia, tiene la capacidad para modular y neutralizar el efecto de componentes tales como midquina (MDK), un regulador negativo de la angiogénesis.
- 40 El implante de la invención se puede funcionalizar con motivos activos biológicos (péptidos y glucopéptidos) para promover respuestas celulares, en particular instrucción miocárdica para mantener fenotipo, permitir el contacto célula con célula, y establecer uniones de salto.
- El implante bioactivo de la invención se puede diseñar para restaurar la forma elíptica o cónica del corazón, en el cual ambos ventrículos están completamente envueltos por el dispositivo. La estructura de este dispositivo consiste en refuerzos especiales a nivel de las bandas anatómicas, formando dos bucles helicoidales de "polímeros sintéticos bioestables no degradables" para la restauración de la forma cónica. La enfermedad geométrica en cardiomiopatía dilatada isquémica es la cámara esférica, que es diferente de la forma del corazón normal elíptica o cónica.
- 45 El implante bioactivo de la presente invención puede comprender adicionalmente células.
- Las células pueden ser células miogénicas o cardiomiogénicas. Según esta realización, las células se seleccionan del grupo que consiste en mioblastos esqueléticos, células del músculo liso, cardiomiocitos fetales y neonatales, cardiomiocitos ventriculares adultos, cardiosferas y progenitores epicárdicos.
- 50 Las células, como alternativa, pueden ser células angiogénicas, tales como la fracción mononuclear de médula ósea

y sangre periférica, progenitores endoteliales de médula ósea y sangre periférica, células endoteliales, células mesoteliales del omento, células madre derivadas de adipocitos, células madre de tejido epicárdico adiposo, y células estrómicas de sangre menstrual multipotentes.

5 Las células también pueden ser células madre pluripotentes. En esta realización, las células se seleccionan del grupo que consiste en células embrionarias, células madre fetales, células del cordón umbilical, células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), células madre mesenquimatosas de la médula ósea (MSCs), células madre pluripotentes de testículos de adulto, y células madre de fluido amniótico de ser humano (hAFSCs). A este respecto, el implante bioactivo se diseña para hospedar células educadas o entrenadas que se espera que crezcan, se multipliquen, se diferencien y se organicen en una fibra de nanoescala dentro de la estructura microporosa del parche, y que se conecten con el miocardio nativo. La combinación del elemento del implante bioactivo junto con las células es tal que presenta una tensión de la pared ventricular reducida, y puede lograr con éxito la regeneración miocárdica.

15 Las fuentes adecuadas de células para la siembra del implante bioactivo y la inyección intrainfarto dependerán de los tipos de enfermedades a tratar. Para infarto de miocardio reciente, serán deseables células angiogénicas que reduzcan la necrosis miocárdica y aumenten el flujo sanguíneo vascular. Para insuficiencia cardíaca crónica, serán útiles células que sustituyan o promuevan la miogénesis, inviertan mecanismos apoptóticos inversos, y reactiven procesos celulares durmientes. Para cardiomiopatía isquémica crónica, se asociarán células tanto angiogénicas como cardiomiogénicas.

20 Según la presente invención, es posible embeber células en una estructura tridimensional que replica la matriz extracelular, lo que es crucial para la restauración tisular completa y la prevención de la remodelación ventricular. La traducción clínica de la terapia celular requiere evitar fármacos y citocinas potencialmente dañinos, y la rápida disponibilidad de células en las estanterías. La combinación de células preferenciadas en un almacén funcionalizado, que libera localmente moléculas personalizadas para promover la terminación in situ de la diferenciación y mejorar la migración e implantación, supervivencia, y funciones, evita los efectos sistémicos indeseados potenciales de la administración de factores de crecimiento, y mejora la restauración tisular.

25 Las células sembradas en el almacén de la matriz y sostenidas por un dispositivo de sostén ventricular sintético tratadas con moléculas de adhesión mejoran la recuperación funcional de corazones infartados y mejoran la evolución a largo plazo al proporcionar regeneración miocárdica y un sostén no agresivo.

30 La combinación de célula-matriz asociada con un material no absorbible de restricción ventricular (envoltura cardíaca de malla), situada sobre el miocardio enfermo, mejora la función ventricular y reduce la remodelación adversa de la cámara.

35 La presente invención combina un enfoque biológico regenerativo con un dispositivo de sostén cardíaco prostético. Las células madre asociadas con un almacén de matriz manipulado tisularmente y combinadas con una envoltura cardíaca de malla deberían reducir fibrosis post-isquémica y ayudar a la recuperación de la viabilidad y cumplimiento miocárdico. Este procedimiento se puede proponer para el tratamiento de cardiomiopatía isquémica, asociando un enfoque biológico regenerativo con un dispositivo de sostén prostético.

La presente invención constituye una plataforma única para manipular mediante ingeniería tejidos contráctiles muy eficientes y potenciar la terapia celular.

40 Para la presente invención, las células se pueden obtener de cualquier fuente adecuada. Se pueden aislar de una fuente adecuada mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Se pueden cultivar según métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las células se pueden añadir al medio de cultivo, el cual puede comprender adicionalmente factores de crecimiento, suero, antibióticos, o cualquiera de una variedad de componentes de cultivo celular conocidos por los expertos en la técnica.

45 La cardiomiopatía isquémica induce alteración geométrica de la cavidad ventricular, que cambia desde una forma elíptica hasta una forma esférica. La enfermedad geométrica en cardiomiopatía dilatada isquémica es la cámara esférica, que es diferente de la forma elíptica o cónica normal del corazón. El índice de esfericidad cuantifica esta alteración de la forma geométrica al comparar el eje ventricular transversal (corto) y el eje largo; una elipse tiene una relación de 0,5 (la longitud es el doble de la anchura), y la esfera es 1,0 debido a dimensiones transversales y longitudinales similares.

50 Según una realización de la invención, la estructura del implante bioactivo de la presente invención consiste en refuerzos especiales a nivel de las bandas anatómicas, que forman dos bucles helicoidales de polímeros sintéticos no degradables bioestables. Esta realización de la presente invención pretende cubrir ambos ventrículos para cardiomiopatía dilatada isquémica. Las bandas artificiales ventriculares helicoidales para la restauración de la forma elíptica del LV usando implantes bioactivos son útiles en el contexto de las estrategias bioquirúrgicas indicadas para manejar pacientes con enfermedades miocárdicas avanzadas. Una ventaja importante de esta técnica es el hecho de que la cirugía se lleva a cabo sin el riesgo de abrir las cámaras ventriculares, es decir, sin circulación extracorpórea.

5 En otro aspecto, la presente invención trata de un método para preparar el implante bioactivo de la invención, que comprende las siguientes etapas de llenar una membrana de armazón microporosa elastomérica con un armazón de hidrogel de nanofibra de péptido, para obtener un constructo bioactivo; el llenado se realiza, por ejemplo, colocando la membrana en una jeringuilla llena del gel y evacuando suavemente el aire en los poros; después, dicho constructo se cultiva en condiciones mecánicas biofísicas (es decir, compresión y alargamiento).

En un aspecto adicional, el método descrito anteriormente comprende además una etapa de sembrar o implantar células sobre o en dicho constructo bioactivo usando los siguientes métodos: mecánico (agitación, centrifugación), químico (electroforesis), físico (electroporación). Las células que se pueden usar son células madre miogénicas, cardiomiogénicas, angiogénicas o pluripotentes.

10 Otro método para preparar el implante bioactivo de la invención comprende las etapas de obtener células madre miogénicas, cardiomiogénicas, angiogénicas o pluripotentes, cultivar dichas células *in vitro*; mezclar dichas células con un armazón de hidrogel de nanofibra de péptido; llenar una membrana de armazón microporosa elastomérica con dicho armazón de hidrogel de nanofibra de péptido, para obtener un constructo bioactivo; y cultivar dicho constructo bioactivo bajo electroestimulación local *in vitro*.

15 En un aspecto específico del método, las células se cultivan bajo tensión de oxígeno reducida.

En todavía un aspecto específico de dicho método, el implante bioactivo se cultiva para adaptarlo al sostén y regeneración ventricular izquierdo y/o ventricular derecho, para envolturas ventriculares parciales completas.

20 La presente invención también se refiere a un método para reparar el miocardio de un individuo, que comprende las etapas de preparar un implante bioactivo según la invención e implantar el implante bioactivo en y/o sobre el miocardio.

En un aspecto más específico, el método para reparar el miocardio comprende una etapa adicional que consiste en inyectar células a través del epicardio durante cirugía cardiotorácica, toracoscopia o procedimientos asistidos por ordenador-robótica. Las células inyectadas pueden ser células madre autólogas, cultivadas en condiciones hipóxicas.

25 **Ejemplo 1: Evaluación biológica de membranas de armazón elastoméricas. Cuantificación de la proliferación celular**

Ensayo de MTT

30 El sistema de MTT es un medio simple, exacto, reproducible de medir la actividad de células vivas vía actividad de deshidrogenasa mitocondrial. El componente clave es bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio o MTT. Las disoluciones de MTT solubilizadas en medios de cultivo tisular o en disoluciones salinas balanceadas, sin rojo fenol, tienen un color amarillento. Las deshidrogenasas mitocondriales de células viables escinden el anillo de tetrazolio, produciendo cristales de MTT formazano de color violeta, que son insolubles en disoluciones acuosas. Los cristales se pueden disolver en isopropanol acidificado. La disolución violeta resultante se mide espectrofotométricamente. Un incremento en el número de células da como resultado un incremento en la cantidad de MTT formazano formada, y un incremento en la absorbancia.

Material y método

40 Se emplearon trozos de membranas porosas de poliacrilato de etilo (PEA100 en lo sucesivo) y un copolímero de acrilato de etilo y acrilato de hidroxietilo con una relación másica de 90:10 de ambos monómeros (en lo sucesivo PEA90). Las membranas se cortaron en trozos de dimensiones 25 mm x 25 mm, con un grosor aproximado de 1,0 mm (PEA100 y PEA90A) y de 0,7 mm (PEA90B). Los poros de las membranas consistieron en capas de familias ortogonales de canales cilíndricos paralelos, con un diámetro del canal de 150 micrómetros y una separación de los canales de 300 micrómetros. Se generaron dejando que los precursores de los polímeros reaccionasen dentro de un molde de la estructura porosa, y disolviendo después el molde.

Protocolo de acondicionamiento de los armazones

45 Debido tanto a su naturaleza hidrófoba como a su estructura microporosa, los armazones elastoméricos necesitan ser prehidratados antes de la siembra de las células. El procedimiento de acondicionamiento consiste en una inmersión durante 24 h en una disolución de PBS. Puede ser necesario el vacío para mejorar la penetración del fluido en los poros, colocando la muestra en un tubo cerrado herméticamente con una tapa agujereada por la aguja de una jeringuilla, y realizando vacío con la jeringuilla. La muestra prehidratada se sumerge entonces en el medio de cultivo. Si el pH cambia, el medio se renueva hasta que el valor del pH de referencia permanece estable.

Siembra de las células

Se aislaron células madre mesenquimatosas de médula ósea (BMC) en condiciones estériles de los huesos del fémur y de la tibia de ratas Wistar. Después de 2 semanas de cultivos *in vitro* en medio completo DMEM con L-glutamina, piruvato sódico y 15% de suero fetal bovino (1ª pasada) se sembraron 10.000 células, diluidas en 0,5 ml

de medio, en los armazones de PEA90 y PEA100 y en matriz de colágeno tridimensional tipo I (n=5 para cada muestra). Después de la siembra cuidadosa de las células usando una micropipeta, los armazones elastoméricos y la matriz de colágeno se mantuvieron 20 minutos sin movimiento, para comenzar la adhesión celular. En la siguiente etapa, y a fin de promover una distribución regular de BMC en los poros de la matriz, se agitaron continuamente durante 10 minutos a 80 g placas de Petri que contienen los armazones/matrices elastoméricos y de colágeno, usando un agitador Orbital (Stuart Scientific, Stone, Staffordshire, UK). Después, los armazones sembrados con las células se incubaron una hora a 37°C. Finalmente, se añadió medio completo DMEM a la cápsula de Petri, y los armazones/matriz sembrados con las células se cultivaron durante 3 semanas a 37°C, 5% de CO₂.

Cuantificación de la propagación celular

Los cultivos se retiraron de la incubadora a una campana de flujo laminar. El sobrenadante se eliminó, y después los armazones se lavaron con PBS dos veces. Los armazones se transfirieron a nuevos tubos (Falcon de 15 ml). Se añadió asépticamente la disolución de MTT en una cantidad igual a 10% del volumen de cultivo (1800 microlitros de medio libre de rojo fenol + 180 microlitros de MTT), y los cultivos se incubaron durante 3 horas a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Se añadieron dos ml de disolución o disolvente de solubilización, y después se sometió a vórtice durante 5 min. Esto provocó la liberación desde el armazón del MTT, que fue reducido activamente por células viables, adquiriendo una coloración amarilla. Cada muestra se centrifugó a 15.000 g durante 5 min., y el sobrenadante se leyó a 570 nm usando un espectrofotómetro de múltiples pocillos.

Resultados

Las evaluaciones espectrofotométricas mostraron valores de densidad óptica (OD) de 0,13 +/- 0,02 para la matriz de colágeno; 0,22 +/- 0,04 para los armazones de PEA90A; 0,11 +/- 0,03 para los armazones de PEA90B; y 0,34 +/- 0,05 para los armazones de PEA100.

Estos resultados mostraron que la proliferación celular estaba bien desarrollada en los armazones elastoméricos, presentando una mejor proliferación que los armazones de colágeno tridimensional. Hasta ahora, los armazones de colágeno se han usado en manipulación de tejido miocárdico experimental y clínico como un patrón oro.

25 **EJEMPLO 2: Evaluación electrofisiológica de las membranas de armazón elastoméricas**

Medidas de la impedancia eléctrica

Conducción eléctrica

La impedancia eléctrica miocárdica ha demostrado ser un indicador eficaz de las características del tejido miocárdico y de la interfaz del tejido con el electrodo. Se han demostrado modificaciones significativas durante la isquemia tisular.

La resistividad eléctrica (también conocida como resistencia eléctrica específica o resistividad volumétrica) es una medida de cuán fuertemente se opone un material al paso de la corriente eléctrica. Una baja resistividad indica un material que permite fácilmente el movimiento de carga eléctrica. La unidad en el SI de la resistividad eléctrica es el ohmio [Ω].

35 **Materiales y métodos**

Se emplearon trozos de membranas porosas de poliacrilato de etilo (PEA100 en lo sucesivo) y un copolímero de acrilato de etilo y acrilato de hidroxietilo con una relación másica de 90:10 de ambos monómeros (en lo sucesivo PEA90). Las membranas se cortaron en trozos de dimensiones 25 mm x 25 mm, con un grosor aproximado de 1,0 mm (PEA100 y PEA90A) y de 0,7 mm (PEA90B). Los poros de las membranas consistieron en capas de familias ortogonales de canales cilíndricos paralelos, con un diámetro de los canales de 150 micrómetros y una separación de los canales de 300 micrómetros. Se generaron dejando que los precursores de los polímeros reaccionasen dentro de un molde de la estructura porosa, y disolviendo después el molde.

Prehidratación de los armazones

Los armazones elastoméricos necesitan 2 días de prehidratación según lo siguiente: inmersión durante 24 h en una disolución de PBS e inmersión durante 24 h en medio de cultivo. El vacío podría ser necesario para mejorar la hidratación tisular, colocando la muestra en un tubo con una tapa y realizando vacío con una jeringuilla. Una vez que se observa cambio de pH, las muestras deberían estar toda la noche en medio de cultivo reciente.

Estudios electrofisiológicos

Dos electrodos que tienen agujas curvas para una inserción fácil se suturaron en los bordes opuestos de los armazones elastoméricos y de una matriz de colágeno tridimensional tipo I (n = 5 para cada muestra). Estos electrodos se concibieron para ser implantados para estimulación cardíaca postoperatoria temporal en cirugía cardíaca. Los armazones y los electrodos implantados se sumergieron en cápsulas de Petri que contienen medio de cultivo celular DMEM. Después de 30 minutos, se llevaron a cabo estudios electrofisiológicos conectando los

electrodos a un Pacing System Analyzer Model 5311 (Medtronic Inc.). Se suministró electroestimulación balanceada de carga bipolar usando los siguientes parámetros: amplitud del pulso 1 voltio, anchura del pulso 0,5 ms, frecuencia de la estimulación 70 pulsos por minuto (ppm). La estimulación se suministró sólo para el ensayo. Después, se evaluó la impedancia eléctrica con los armazones.

5 Resultados

Se llevaron a cabo medidas eléctricas en cada grupo de preparación, es decir, medio celular solo, matriz de colágeno, armazón de PEA90A, armazones de PEA90B, armazones de PEA100. Cada grupo consistió en 5 muestras.

10 Las medidas de la impedancia mostraron los siguientes valores: medio de cultivo celular 292 +/- 25 ohmios, matriz de colágeno 230 +/- 21 ohmios; armazones de PEA90A 321 +/- 34 Ohmios; armazones de PEA90B 345 +/- 33 ohmios; armazones de PEA100 340 +/- 29 ohmios.

	Medio celular	Matriz de colágeno	Armazón de PEA90A	Armazón de PEA90B	Armazón de PEA100
Impedancia [Ω]	292	230	321	345	340
Corriente [mA]	3,42	4,35	3,11	2,90	2,94

Pulso de la estimulación; 1,0 V, 0,5 ms.

15 Estos resultados mostraron que todos los materiales evaluados presentan propiedades de conducción eléctrica, es decir, resistencia, similares a las encontradas con tejidos cardíacos, y de este modo estos armazones tienen el potencial para ser usados para la sustitución miocárdica.

EJEMPLO 3

20 El músculo cardíaco que falla necesita ser sostenido crónicamente para disminuir el esfuerzo de la pared ventricular y también para ser regenerado para mejorar la función ventricular. Este Ejemplo demuestra que la asociación de células madre con una matriz de colágeno y una malla de poliéster para el envoltorio cardíaco proporciona mejores resultados que la implantación de una malla de poliéster sola.

25 Para ilustrar esta realización, quince ovejas sufrieron 1 hora de isquemia miocárdica quirúrgica seguido de perfusión. Se crearon tres grupos: Grupo 1: oclusión coronaria sin tratamiento (grupo de control). Grupo 2: restricción del LV usando una malla de poliéster para envoltura cardíaca. Grupo 3: el área isquémica se trató asociando células madre, una matriz de colágeno y una malla de poliéster. Células madre autólogas derivadas de tejido adiposo (ASC), cultivadas en condiciones hipóxicas (5%), se marcaron con BrdU y se inyectaron en el área infartada y en una matriz de colágeno. A los 3 meses, los animales se evaluaron con estudios de ecocardiografía e histopatológicos.

Extracción de biopsias

30 En 15 ovejas Rambouillet hembras que pesan 32 a 37 kg (media $35 \pm 2,2$ kg), se retiró tejido graso subcutáneo para el aislamiento y expansión de células madre. Se usaron células autólogas todo el tiempo a fin de evitar cualquier problema de histocompatibilidad. Las biopsias de tejido adiposo se obtuvieron mediante retirada de tejido graso subcutáneo (40-60 gramos) de la pared torácica derecha, y se almacenaron en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) a temperatura ambiente hasta el procesamiento.

35 Aislamiento y cultivo hipóxico de células madre derivadas de tejido adiposo (ASC)

40 Las muestras tisulares se picaron finamente y se digirieron mediante incubación con 0,14 unidades Wünsch/ml de disolución Liberase Blendzyme 2 (Roche Applied Science, Hvidovre, Dinamarca) a 37°C durante dos horas. Las digestiones se centrifugaron a 400 g durante 10 min., y el fluido superior y las capas de grasa se desecharon. Los eritrocitos contaminantes se lisaron resuspendiendo el pelete en agua milli-Q estéril durante 20 segundos, después de lo cual la concentración de sal se ajustó mediante la adición de 10x PBS. Las células se filtraron a través de un colador celular de 100 μ m, se centrifugaron a 400g durante 10 min., y se resuspendieron en 25 ml de medio de crecimiento, que consiste en medio esencial mínimo alfa (A-MEM) (GIBCO/Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), y penicilina (10 U/ml), estreptomina (10 mg/ml), gentamicina (10 mg/ml) (todas ellas de GIBCO/Invitrogen). Las células se sembraron en un matraz T75 y se transfirieron a una incubadora de CO₂ toda la noche, después de lo cual se eliminaron las células no adherentes. Los matraces se transfirieron entonces a un banco de trabajo/incubadora hipóxica (Xvivo; Biospherix, Lacona, NY), que permite el cultivo celular sin interrupciones y el paso en una atmósfera controlada de 5% de O₂ y 5% de CO₂ balanceado con nitrógeno. Durante la expansión de las células, el medio se cambió dos veces a la semana. Cuando las células tuvieron una confluencia

de 90%, las células se despegaron de los matraces de cultivo usando 0,125% de tripsina/0,01% de EDTA, y se transfirieron a nuevos matraces.

Marcaje con bromodesoxiuridina

- 5 Para cada muestra, las células se expandieron hasta que ocho matraces de cultivo T175 tuvieron una confluencia de 75%, y entonces las células se marcaron con bromodesoxiuridina (BrdU). De forma breve, las células se incubaron con medio de crecimiento que contiene 10 microgramos de BrdU (Sigma) durante 48 horas, y después las células se lavaron varias veces con PBS y se congelaron en alícuotas de aproximadamente 10×10^6 células.

Lesión miocárdica experimental

- 10 Tras la medicación preoperatoria y la inducción de la anestesia (el mismo protocolo que las biopsias de tejido graso), los animales se intubaron y se ventilaron mecánicamente con un sistema Aestiva/5 (Datex-Ohmeda, Helsinki, Finlandia). El electrocardiograma se monitorizó durante la operación. Se colocó una línea venosa central a través de la vena yugular externa para la administración de infusiones de fluidos y de fármacos. Se llevó a cabo una toracotomía izquierda a nivel del 5º espacio intercostal, y se expuso el corazón. Para reducir el riesgo de cicatrización ventricular, se realizó durante todo el procedimiento quirúrgico una perfusión continua IV (2 mg/kg por hora) de xilocaína al 1% (Lidocaína, AstraZeneca). En todos los animales, se creó quirúrgicamente una isquemia miocárdica del LV mediante ligación transitoria (60 minutos) de la rama diagonal principal de la arteria coronaria izquierda, seguido de la reperfusión. Se hizo pasar una sutura de Prolene no absorbible 4-0 por debajo de la rama de la arteria coronaria, el caudal se interrumpió usando una compresa de teflón comprimida por un oclisor de poliuretano. Este oclisor se liberó después de 60 minutos, y de este modo se reperfusiónó el territorio isquémico miocárdico. Cambios del EKG significativos, incluyendo una mayor anchura del complejo QRS y la elevación del segmento ST, y cambios de color y cinéticos del área de riesgo fueron considerados indicativos de oclusión coronaria.
- 15
- 20

Grupos de tratamiento

Los animales se distribuyeron al azar en 3 grupos:

- 25 Grupo 1 (n = 5): isquemia miocárdica sin tratamiento (grupo de control).
- Grupo 2 (n = 5): implantación tras la isquemia de un dispositivo de envoltura ventricular de malla.
- Grupo 3 (n = 5): inyección intrainfarto tras la isquemia de células madre, implantación de una matriz de colágeno como interfaz, e implantación del dispositivo de envoltura ventricular de malla.

Inyección de células e implantación de matriz de colágeno

- 30 En los animales del Grupo 3, 1 hora después del infarto, se inyectaron células en la zona infartada usando una aguja de calibre 27. Las inyecciones consistieron en 99 ± 12 millones de células, 50% (2 ml) inyectadas en el infarto y 50% (5 ml) sembradas en una matriz de colágeno tridimensional tipo I.

- 35 Para el tratamiento miocárdico, se usaron seis puntos de agujas de inyección en cada animal, y la hinchazón sobre el área del infarto miocárdico se confirmó en cada caso tras la inyección. Los criterios para guiar las inyecciones epicárdicas fueron la decoloración de la superficie ventricular y la hipocinesia.

Preparación de la matriz de colágeno

- 40 Se preparó matriz de colágeno a partir de un kit de colágeno comercialmente disponible CE Mark (Pangen 2, Urgo Laboratory, Chenove, Francia). Esta matriz biodegradable tridimensional (tamaño: 5 x 7 x 0,6 cm) se fabricó usando un colágeno nativo tipo I no desnaturalizado, liofilizado. Los poros de la matriz midieron 50 a 100 μm . En el quirófano y en condiciones de esterilidad elevada, la matriz se colocó en una cápsula de Petri; después, la suspensión celular (50 ± 6 millones de células diluidas en 5 ml de medio) se sembró sobre la matriz. Para promover una distribución regular de ASC en los poros de la matriz, las cápsulas de Petri que contienen la matriz de colágeno se agitaron continuamente durante 10 minutos a 160g usando un agitador orbital (Stuart Scientific, Stone, Staffordshire, UK).

Envoltura cardíaca de malla

- 45 Para evitar inestabilidad hemodinámica y arritmias durante la implantación, se comenzó por fijar la envoltura cardíaca de malla (dispositivo de poliéster (CorCap) antes de la creación de la isquemia miocárdica. En todos los casos se escogió el CorCap modelo Gen2 CSD Tamaño B (Acorn Cardiovascular Inc, St Paul, MN, USA), después se abrió longitudinalmente, se deslizó por detrás de los ventrículos y se fijó con 2 suturas epicárdicas laterales (Prolene 4-0). Después, se creó la isquemia seguido de reperfusión. Una hora más tarde, se inyectaron las células, se implantó la matriz de colágeno, y la parte anterior del CorCap se cerró usando una sutura continua (Prolene 2-0). La fijación del dispositivo se terminó mediante múltiples suturas individuales a lo largo del surco anterior auriculo-ventricular.
- 50

Resultados

No se observó mortalidad. El tratamiento hipóxico para cultivos celulares demostró una mejora bastante drástica de la tasa de proliferación: bajo hipoxia, las células crecieron más rápido. La electrocardiografía mostró una dilatación del volumen de LVED (dimensión diastólica del extremo ventricular izquierdo) en ambos grupos tratados (malla de poliéster sola $35,6 \pm 5$ ml, y con terapia celular $32,6 \pm 4$ ml) frente al control ($65 \pm 6,3$ ml, $p < 0,01$ para ambas comparaciones). La EF (fracción de eyección) fue significativamente mayor en los corazones tratados con la malla de poliéster + células/colágeno ($55,8 \pm 3,8\%$), en comparación con aquellos que reciben solamente la envoltura de poliéster ($44,1 \pm 2,3\%$) ($p = 0,04$) o sin tratamiento ($34,8 \pm 3,6\%$) ($p = 0,01$). El tiempo de desaceleración (DT) de la válvula mitral derivado por dópler mejoró de $140 \pm 6,3$ ms a $195 \pm 9,5$ ms ($p = 0,03$) en el grupo de CorCap de células-colágeno, pero no en los otros grupos. La histología mostró, en el grupo tratado con células, áreas isquémicas multifocales mucho menos prominentes que en otros grupos, con focos de angiogénesis y células injertadas viables. Se observó en el Grupo 3 interfaz de fibrosis mínima entre la malla de poliéster y el epicardio, probablemente debido a la interposición del colágeno sembrado con células.

Comentarios

En el modelo isquémico, las células madre asociadas con una matriz de colágeno y una malla de poliéster para la envoltura cardíaca mejora la EF y la función diastólica, reduciendo la remodelación y la fibrosis adversas. Este procedimiento que asocia un enfoque biológico regenerativo con un dispositivo de sostén prostético parece ser apropiado para el tratamiento de insuficiencia cardíaca isquémica avanzada.

EJEMPLO 4

Este Ejemplo clínico demuestra que una matriz de colágeno sembrada de células asociada con terapia celular intrainfarto proporciona mejores resultados que la célula madre sola.

Preparación de la matriz

Se preparó una matriz biodegradable tridimensional (tamaño: $5 \times 7 \times 0,7$ cm) fabricada usando colágeno bovino liofilizado tipo I. Los poros de la matriz midieron 50 a $100 \mu\text{m}$. En el quirófano y bajo condiciones de esterilidad elevada, la matriz se colocó en una cápsula de Petri; después, la suspensión celular (250 ± 28 millones de células diluidas en 10 ml de medio) se sembró sobre y en la matriz. Para promover una distribución regular de células en la matriz, las cápsulas de Petri que contienen la matriz se agitaron continuamente durante 10 minutos a 160g usando un agitador orbital (Stuart Scientific, Stone, Staffordshire, UK).

Procedimiento quirúrgico

En 10 pacientes (edad media $52,6$ años), tras la esternotomía, se llevó a cabo un único OP-CABG (injerto de derivación de la arteria coronaria sin bomba) usando arteria mamaria interna izquierda (LIMA). Al final de la cirugía, se inyectaron 250 ± 28 millones de células, diluidas en 5 ml de medio, en el área infartada y en la zona de los bordes, usando una aguja oftálmica retrobulbar de $25\text{G} \times 40$ mm. Después se colocó la matriz sembrada de células, cubriendo el área infartada, y se fijó al epicardio con 6 suturas PDS (6-0).

En otro grupo de 10 pacientes (edad media $56,8$ años), se llevó a cabo un único OP-CABG. Se inyectaron células madre en la cicatriz del infarto, pero no se usó matriz sembrada en este grupo.

Resultados

No hubo mortalidad y ningún suceso adverso relacionado (seguimiento $10 \pm 3,5$ meses). NYHA FC mejoró en ambos grupos de $2,3 \pm 0,5$ a $1,3 \pm 0,5$ (matriz, $p = 0,0002$) frente a $2,4 \pm 0,5$ a $1,5 \pm 0,5$ (sin matriz, $p = 0,001$). El volumen diastólico del extremo del LV evolucionó de $142,4 \pm 24,5$ a $112,9 \pm 27,3$ ml (matriz, $p = 0,02$) frente a $138,9 \pm 36,1$ a $148,7 \pm 41$ ml (sin matriz, $p = 0,57$), el tiempo de desaceleración de llenado del LV mejoró significativamente en el grupo de la matriz de 162 ± 7 ms a 198 ± 9 ms ($p = 0,01$) frente al grupo sin matriz (de 159 ± 5 ms a 167 ± 8 ms, $p = 0,07$). El grosor del área cicatrizal progresa de $6 \pm 1,4$ a $9 \pm 1,1$ mm (matriz, $p = 0,005$) frente a $5 \pm 1,5$ a $6 \pm 0,8$ mm (sin matriz, $p = 0,09$). La EF mejoró en ambos grupos, de $25,3 \pm 7,3$ a $32 \pm 5,4\%$ (matriz, $p = 0,03$) frente a $27,2 \pm 6,9$ a $34,6 \pm 7,3\%$ (sin matriz, $p = 0,031$).

Comentarios

Este estudio clínico mostró que el trasplante celular asociado con una matriz de colágeno sembrada de células aumentó el grosor de la cicatriz del infarto con tejidos viables, y ayudó a normalizar el esfuerzo de la pared cardíaca en regiones lesionadas (efecto de armazón), limitando así la remodelación ventricular y mejorando la función diastólica. Los pacientes tratados sin la matriz de colágeno sembrada con células no mostraron limitación de remodelación post-isquémica ni mejoras en la función diastólica.

EJEMPLO 5: PREPARACIÓN DE UN MATERIAL HÍBRIDO PARA EL CULTIVO TRIDIMENSIONAL CON PROPIEDADES MECÁNICAS MEJORADAS QUE LLENA MEMBRANAS ELASTOMÉRICAS CON PÉPTIDOS

SINTÉTICOS AUTOENSAMBLADORES RESUSPENDIDOS EN AGUA**PROPIEDADES MECÁNICAS DE ARMAZONES TRIDIMENSIONALES**

5 Durante las últimas décadas, la cardiomioplastia celular se ha convertido en un estado de la técnica para afecciones cardíacas. Consiste en introducir células miocárdicas o células madre (con y sin matrices tridimensionales) en los ventrículos infartados, tratando de recuperar la función perdida. El inconveniente es que se demostró que había un número bajo de células capaces de sobrevivir en estas condiciones; parcialmente debido a que no pueden soportar las fuerzas mecánicas del tejido receptor.

10 Los armazones tridimensionales como RAD16-I (péptidos autoensambladores resuspendidos en agua) permiten a las células formar una red funcional en el almacén de lámina β formado, pero adicionalmente es indispensable que el almacén pueda soportar el latido del corazón. Las membranas elastoméricas pueden ofrecer estas propiedades mecánicas.

TINCIÓN CON ROJO CONGO

15 La tinción con rojo Congo es un método simple para apreciar la formación de láminas β de autoensamblaje RAD16-I típica. El reactivo está en forma de sal sódica del ácido bencidindiazo-bis-1-naftilamina-4-sulfónico (fórmula: $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$), y su configuración permite el enlace de hidrógeno de los grupos azo y amina del colorante a radicales hidroxilo separados similarmente, dando una coloración roja.

MATERIAL Y MÉTODOS

20 Se emplearon trozos de membranas porosas de poliacrilato de etilo (PEA100 en lo siguiente) y un copolímero de acrilato de etilo y acrilato de hidroxietilo con una relación másica de 90:10 de ambos monómeros (en lo sucesivo PEA90) como membranas elastoméricas. Las membranas se cortaron en trozos de dimensiones 0,5 cm X 0,5 cm, con un grosor aproximado de 1,0 mm (PEA100 y PEA90). Los poros de las membranas consistieron en capas de familias ortogonales de canales cilíndricos paralelos, con diámetro de los canales de 150 micrómetros y separación de los canales de 300 micrómetros. Se generaron dejando que los precursores de los polímeros reaccionasen dentro de un molde de la estructura porosa, y disolviendo después el molde.

25 El péptido autoensamblador RAD16-I se usó como almacén tridimensional. El lote se preparó en una disolución al 1% de sacarosa al 10%, evitando el autoensamblado producido por el incremento de la fuerza iónica. La disolución madre se diluyó hasta la concentración deseada en sacarosa al 10% para cada experimento.

Prehidratación de los armazones

30 Los armazones elastoméricos necesitan ser precondicionados antes de la adición del péptido. Inicialmente, las membranas se esterilizaron usando tres lavados con EtOH al 70%, y dejándolas secar en aire durante 10 min. Después de este pretratamiento, los armazones se hidrataron según lo siguiente: 30 min. de inmersión durante 30 min. en una disolución de PBS con vacío, y tres lavados con sacarosa al 10%. El vacío fue necesario para asegurar que todos los poros están llenos con la disolución acuosa, y la disolución isotónica fue necesaria para evitar el autoensamblado durante el primer contacto entre las membranas y el péptido. Después de este tratamiento, las membranas se secaron hasta humedad, puesto que el secado completo volvería a las membranas a su hidrofobia inicial.

Llenado de las membranas con el péptido RAD16-I

40 Las membranas pretratadas se introdujeron dentro de un inserto de cultivo celular de 9 mm de diámetro (PICM01250, Millipore, Billerica, MA). Después, se cargó el péptido RAD16-I al 0,15% en sacarosa al 10%, con cuidado, sobre la parte superior de la membrana usando una micropipeta. Después de cargar el péptido, se colocaron fuera del inserto 500 μ l de medio completo DMEM con L-glutamina, piruvato de sodio y suero fetal bovino al 15%. El péptido se dejó autoensamblar en la cabina de flujo durante 20 min. En este punto, el medio penetra en el inserto desde la membrana inferior, induciendo un autoensamblado de RAD16-I desde la parte inferior hasta la parte superior dentro de la membrana. Para eliminar por lavado la sacarosa restante, el medio se añadió en etapas secuenciales sobre la parte superior del ensamblaje, y se dejó infiltrar. Finalmente, se cargaron 500 μ l dentro del inserto, y 2,5 ml en el pocillo fuera del inserto.

RESULTADOS Y COMENTARIOS

Ambas membranas, PEA100 y PEA90, se llenaron con el péptido RAD16-1. Cada grupo consistió en 2 muestras. Por lo tanto, se consideró un material compuesto: membranas elastoméricas + péptidos autoensambladores.

50 Los resultados mostraron que la membrana de PEA100 permitió a RAD16-I llenar más fácilmente los poros que la membrana de PEA90. De este modo, parece que el polímero PEA100 más hidrófobo es preferible en principio, a fin de obtener el sistema combinado con propiedades mecánicas mejoradas en comparación con aquellos del gel peptídico, que permitiría mantener el latido del corazón.

REFERENCIAS

- Solicitud de Patente U.S. 2005018973: Self-assembling peptides incorporating modifications and methods of use thereof. Por: C. Semino et al.
- 5 Solicitud de Patente U.S. 20090297579: Control of cells and cell multipotentiality in three dimensional matrices. Por: C. Semino et al.
- Documento U.S. 4.735.205, 1988: Method and apparatus including a sliding insulation lead for cardiac assistance. Por: JC Chachques, et al.
- Documento U.S. 7.341.062, 2008: Method of providing a dynamic cellular cardiac support. Por: JC Chachques, et al.
- 10 Solicitud de Patente (España) P200702205.2: Población de células madre adultas derivadas de tejido adiposo cardiaco y su uso en regeneración cardiaca. Por: A. Bayes Genis et al.
- Bayes-Genis A, Roura S, Prat-Vidal C, Farrb J, Soler-Botija C, de Luna AB, Cinca J. Chimerism and microchimerism of the human heart: evidence for cardiac regeneration. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2007; 4 Suppl 1:S40-5.
- 15 Brigido Diego R, Pérez Olmedilla M, Serrano Aroca A, Gómez Ribelles JL, Monleón Pradas M, Gallego Ferrer G, Salmerón Sánchez M. Acrylic scaffolds with interconnected spherical pores and controlled hydrophilicity for tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med* 2005; 16:693-698.
- Chachques JC, Trainini JC, Lago N, Cortes-Morichetti M, Schussler O, Carpentier A. Myocardial Assistance by Grafting a New bioartificial Upgraded Myocardium (MAGNUM trial): clinical feasibility study. *Ann Thorac Surg.* 2008; 85:901-8.
- 20 Chachques JC, Duarte F, Cattadori B, Shafy A, Lila N, Chatellier G, Fabiani JN, Carpentier AF. Angiogenic growth factors and/or cellular therapy for myocardial regeneration: a comparative study. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004; 128:245-53.
- Cortes-Morichetti M, Frati G, Schussler O, Van Huyen JP, Lauret E, Genovese JA, Carpentier AF, Chachques JC. Association between a cell-seeded collagen matrix and cellular cardiomyoplasty for myocardial support and regeneration. *Tissue Eng.* 2007;13:2681-7.
- 25 Dai W, Hale SL, Kay GL, Jyrala AJ, Kloner RA. Delivering stem cells to the heart in a collagen matrix reduces relocation of cells to other organs as assessed by nanoparticle technology. *Regen Med.* 2009;4:387-95.
- Farré J, Roura S, Prat-Vidal C, Soler-Botija C, Llach A, Molina CE, Hove-Madsen L, Cairó JJ, Godia F, Bragós R, Cinca J, Bayes-Genis A. FGF-4 increases in vitro expansion rate of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Growth Factors.* 2007;25:71-6.
- 30 Fong WJ, Tan HL, Choo A, Oh SKW. Perfusion cultures of human 679 embryonic stem cells. *Bioprocess Biosyst.* 2005; 27:381-387.
- Garreta E, Genové E, Borrós S, Semino CE. Osteogenic differentiation of mouse embryonic stem cells and mouse embryonic fibroblasts in a three-dimensional self-assembling peptide scaffold. *Tissue Eng.* 2006; 12:1-13.
- 35 Genové E., Shen C., Zhang S, Semino CE. The effect of functionalized self-assembling peptide scaffolds on human aortic endothelial cell function. *Biomaterials* 2005; 26:3341-3351.
- Norvell SM, Alvarez M, Bidwell JP, Pavalko FM. Fluid shear stress induces beta-catenin signaling in osteoblasts. *Cacif Tissue Eng.* 2004; 75:396-404.
- 40 Pérez Olmedilla M, N Garcia-Giralt, M Monleón Pradas, P Benito Ruiz, J L Gómez Ribelles, E Cáceres Palou, J C Monllau García. Response of human chondrocytes to a non-uniform distribution of hydrophilic domains on poly(ethyl acrylate-co-hydroxyethyl methacrylate) copolymers. *Biomaterials* 2006; 27:1003-1012.
- Rodríguez Hernández JC, Salmerón Sánchez M, Soria JM, Gómez Ribelles JL, Monleón Pradas M. Substrate chemistry-dependent conformations of single laminin molecules on polymer surfaces are revealed by the phase signal of atomic force microscopy. *Biophysical Journal* 2007; 93:202-207.
- 45 Rodríguez Hernández JC, Serrano Aroca A, Gómez Ribelles JL, Monleón Pradas M. Three-dimensional nanocomposite scaffolds with ordered cylindrical orthogonal pores. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomaterials* 2008; 84 B:541-549.
- Roura S, Farré J, Soler-Botija C, Llach A, Hove-Madsen L, Cairó JJ, Godia F, Cinca J, Bayes-Genis A. Effect of aging on the pluripotential capacity of human CD105+ mesenchymal stem cells. *Eur J Heart Fail.* 2006; 8:555-63.

- Semino CE, Kamm RD, Lauffenburger DA. Autocrine EGF receptor activation mediates endothelial cell migration and vascular morphogenesis induced by VEGF under interstitial flow. *Exp Cell Res.* 2006; 312: 289.
- zur Nieden NI, Ruf LJ, Kempka G, Hildebrand H, Ahr HJ. Molecular markers in embryonic stem cells. *Toxicol In Vitro* 2001; 15:455-461.
- 5 zur Nieden NI, Cormier JT, Rancourt DE, Kallos MS. Murine embryonic stem cells maintain pluripotency after long-term culture in suspension bioreactors. *J Biotechnol.* 2007a; 129:421-432.
- Spadaccio C, Chachques E, Chello M, Covino E, Chachques JC, Genovese J. Predifferentiated adult stem cells and matrices for cardiac cell therapy. *Asian Cardiovasc Thorac Ann.* 2010;18:79-87.
- 10 Chachques JC. Cellular cardiac regenerative therapy in which patients? *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2009;7:911-9. Martinez EC, Wang J, Gan SU, Singh R, Lee CN, Kofidis T. Ascorbic acid improves embryonic cardiomyoblast cell survival and promotes vascularization in potential myocardial grafts in vivo. *Tissue Eng Part A.* 2010, 16:1349-61.
- Martinez EC, Kofidis T. Myocardial tissue engineering: the quest for the ideal myocardial substitute. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2009;7:921-8.
- 15 Genovese JA, Spadaccio C, Chachques E, Schussler O, Carpentier A, Chachques JC, et al. Cardiac pre-differentiation of human mesenchymal stem cells by electrostimulation. *Front Biosci* 2009;14:2996-3002.
- Shafy A, Lavergne T, Latremouille C, Cortes-Morichetti M, Carpentier A, Chachques JC. Association of electrostimulation with cell transplantation in ischemic heart disease. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009;138:994-1001.
- Gaetani R, Ledda M, Barile L, Chimenti I, De Carlo F, Forte E, et al. Differentiation of human adult cardiac stem cells exposed to extremely low-frequency electromagnetic fields. *Cardiovasc Res* 2009;82:411-20.
- 20 Schussler O, Coirault C, Louis-Tisserand M, Al-Chare W, Oliviero P, Menard C, Michelot R, Bochet P, Salomon DR, Chachques JC, Carpentier A, Lecarpentier Y. Use of arginine-glycine-aspartic acid adhesion peptides coupled with a new collagen scaffold to engineer a myocardium-like tissue graft. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2009;6:240-9.
- Semino CE. Can we build artificial stem cell compartments? *J Biomed Biotechnol* 2003;2003:164-9.
- 25 Genove E, Shen C, Zhang S, Semino CE. The effects of functionalized self-assembling peptide scaffolds on human aortic endothelial cell function. *Biomaterials* 2005;26:3341-51.
- Quintana L, Muiños TF, Genove E, Del Mar Olmos M, Borrós S, Semino CE. Early tissue patterning recreated by mouse embryonic fibroblasts in a three-dimensional environment. *Tissue Eng Part A* 2009; 15:45-54.
- Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100: 12313-12318.
- 30 Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 1990; 81:1161-72.
- Laflamme MA, Murry CE. Regenerating the heart. *Nat Biotechnol.* 2005; 23:845-56.
- Rajnoch C, Chachques JC, Berrebi A, Bruneval P, Benoit MO, Carpentier A. Cellular therapy reverses myocardial dysfunction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 121: 871-878.
- 35 Chachques JC, Acar C, Herreros J, Trainini J, Prosper F, D'Attellis N, Fabiani JN, Carpentier A. Cellular cardiomyoplasty: clinical application. *Ann Thorac Surg.* 2004; 77:1121-1130.
- Stamm C, Kleine HD, Choi YH, et al. Intramyocardial delivery of CD133+ bone marrow cells and coronary artery bypass grafting for chronic ischemic heart disease: safety and efficacy studies. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007; 133:717-25.
- 40 Assmus B, Honold J, Schachinger V, et al. Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2006;355:1222-32.
- Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, et al; REPAIR-AMI Investigators. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2006;355:1210-21.
- 45 Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, et al. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation* 2006; 113:1287-1294.
- Janssens S, Dubois C, Bogaert J, et al. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2006;367:113-21.

- Lunde K, Solheim S, Aakhus S, et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2006;355:1199-209.
- Teng CJ, Luo J, Chiu RC, Shum-Tim D. Massive mechanical loss of microspheres with direct intramyocardial injection in the beating heart: implications for cellular cardiomyoplasty. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2006;132:628-32.
- 5 Brown L. Cardiac extracellular matrix: a dynamic entity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; 289:H973-4.
- Piao H, Kwon JS, Piao S, et al. Effects of cardiac patches engineered with bone marrow-derived mononuclear cells and PGCL scaffolds in a rat myocardial infarction model. *Biomaterials* 2007;28:641-9.
- Zimmermann WH, Melnychenko I, Wasmeier G, et al. Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. *Nat Med.* 2006;12:452-458.
- 10 Christman KL, Lee RJ. Biomaterials for the treatment of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:907-13.
- Kutschka I, Chen IY, Kofidis T, et al. Collagen matrices enhance survival of transplanted cardiomyoblasts and contribute to functional improvement of ischemic rat hearts. *Circulation.* 2006; 114(1 Suppl):I167-73.
- Chachques JC, Herreros J, Trainini J, et al. Autologous human serum for cell culture avoids the implantation of cardioverter-defibrillators in cellular cardiomyoplasty. *Int J Cardiol.* 2004; 95 (Suppl 1):S29-S33.
- 15 Herpel E, Pritsch M, Koch A, Dengler TJ, Schirmacher P, Schnabel PA. Interstitial fibrosis in the heart: differences in extracellular matrix proteins and matrix metalloproteinases in end-stage dilated, ischaemic and valvular cardiomyopathy. *Histopathology* 2006; 48:736-47.
- Lunkenheimer PP, Redmann K, Westermann P, et al. The myocardium and its fibrous matrix working in concert as a spatially netted mesh: a critical review of the purported tertiary structure of the ventricular mass. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2006;29 Suppl 1:S41-9.
- 20 Kresh JY. Cell replacement therapy: the functional importance of myocardial architecture and intercellular gap-junction distribution. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2006; 131:1310-3.
- Eschenhagen T, Zimmermann WH. Engineering myocardial tissue. *Circ Res.* 2005; 97:1220-31.
- Leor J, Landa N, Cohen S. Renovation of the injured heart with myocardial tissue engineering. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2006; 4:239-52.
- 25 Kofidis T, de Bruin JL, Hoyt G, et al. Myocardial restoration with embryonic stem cell bioartificial tissue transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2005; 24:737-44.
- Giraud MN, Armbruster C, Carrel T, Tevæarai HT. Current state of the art in myocardial tissue engineering. *Tissue Eng.* 2007;13:1825-36.
- 30 Fedak PW, Szmitko PE, Weisel RD, et al. Cell transplantation preserves matrix homeostasis: a novel paracrine mechanism. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005;130:1430-9.
- Kubal C, Sheth K, Nadal-Ginard B, Galinanes M. Bone marrow cells have a potent anti-ischemic effect against myocardial cell death in humans. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2006;132:1112-8.
- 35 Thum T, Bauersachs J, Poole-Wilson PA, Volk HD, Anker SD. The dying stem cell hypothesis: immune modulation as a novel mechanism for progenitor cell therapy in cardiac muscle. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46:1799-802.
- Ebelt H, Jungblut M, Zhang Y, et al. Cellular cardiomyoplasty: improvement of left ventricular function correlates with the release of cardioactive cytokines. *Stem Cells.* 2007;25:236-44.
- Blom AS, Pilla JJ, Arkles J, Dougherty L, Ryan LP, Gorman JH 3rd, Acker MA, Gorman RC. Ventricular restraint prevents infarct expansion and improves borderzone function after myocardial infarction: a study using magnetic resonance imaging, three-dimensional surface modeling, and myocardial tagging. *Ann Thorac Surg.* 2007;84: 2004-10.
- 40 Starling RC, Jessup M, Oh JK, Sabbah HN, Acker MA, Mann DL, Kubo SH. Sustained benefits of the CorCap Cardiac Support Device on left ventricular remodeling: three year follow-up results from the Acorn clinical trial. *Ann Thorac Surg.* 2007;84:1236-42.
- 45 Mann DL, Acker MA, Jessup M, Sabbah HN, Starling RC, Kubo SH; Acorn Trial Principal Investigators and Study Coordinators. Clinical evaluation of the CorCap Cardiac Support Device in patients with dilated cardiomyopathy. *Ann Thorac Surg.* 2007;84:1226-35.

- Klodell CT Jr, Aranda JM Jr, McGiffin DC, Rayburn BK, Sun B, Abraham WT, Pae WE Jr, Boehmer JP, Klein H, Huth C. Worldwide surgical experience with the Paracor HeartNet cardiac restraint device. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2008;135:188-95.
- 5 Klodell CT Jr, McGiffin DC, Rayburn BK, Sun B, Abraham WT, Conte JV, Russell SD, Pae WE Jr, Boehmer JP, Aranda JM Jr. Initial United States experience with the Paracor HeartNet myocardial constraint device for heart failure. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007;133:204-9.
- Torrent-Guasp F, Ballester M, Buckberg GD, Carreras F, Flotats A, Carrio I, Ferreira A, Samuels LE, Narula J. Spatial orientation of the ventricular muscle band: physiologic contribution and surgical implications. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001;122:389-92.
- 10 Buckberg GD, Weisfeldt ML, Ballester M, Beyar R, Burkhoff D, Coghlan HC, Doyle M, Epstein ND, Gharib M, Ideker RE, Ingels NB, LeWinter MM, McCulloch AD, Pohost GM, Reinlib LJ, Sahn DJ, Sopko G, Spinale FG, Spotnitz HM, Torrent-Guasp F, Shapiro EP. Left ventricular form and function: scientific priorities and strategic planning for development of new views of disease. *Circulation.* 2004;110:e333-6.
- 15 Kocica MJ, Corno AF, Carreras-Costa F, Ballester-Rodes M, Moghbel MC, Cueva CN, Lackovic V, Kanjuh VI, Torrent-Guasp F. The helical ventricular myocardial band: global, three-dimensional, functional architecture of the ventricular myocardium. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2006;29 Suppl 1:S21-40.

REIVINDICACIONES

1. Un implante bioactivo para la regeneración miocárdica y el sostén de la cámara ventricular, que comprende:

I. una membrana de armazón microporosa elastomérica que comprende al menos un polímero sintético no degradable, un polímero sintético parcialmente degradable, y biomateriales de nanofibra, teniendo dicha membrana una porosidad comprendida entre 70% y 90%, estando los poros interconectados y teniendo diámetros comprendidos entre 80 micrómetros y 150 micrómetros, en la que

a. dicho polímero sintético no degradable se selecciona del grupo que consiste en poliacrilato de etilo y poliacrilato de etilo copolimerizado con un comonomero de acrilato de hidroxietilo al 10% en peso o al 20% en peso; y

b. dicho polímero sintético parcialmente degradable se selecciona del grupo que consiste en éster 2-(metilacrililoiloxi)etílico de caprolactona o en éster 2-(metilacrililoiloxi)etílico de caprolactona copolimerizado con acrilato de etilo en proporciones en peso de este último comonomero comprendidas entre 30% y 80%,

en la que el porcentaje de polímeros no degradables frente a polímeros degradables está comprendido entre 10% en peso y 90% en peso, y

II. un armazón de hidrogel de nanofibras.

2. El implante bioactivo de la reivindicación 1, en el que dicho armazón de hidrogel de nanofibras incluye moléculas naturales seleccionadas del grupo que consiste en matrices derivadas de proteína, péptido, oligosacárido, polisacárido, o proteoglicano tales como colágenos, fibrinas, alginatos, quitosanos, ácido hialurónico y/o moléculas sintéticas que se desarrollarán en una red de nanofibras con propiedades de gel/hidrogel, seleccionadas del grupo que consiste en armazones de hidrogel de nanofibras peptídicas tales como el péptido AcN-RADARADARADA-COONH₂.

3. El implante bioactivo de la reivindicación 1 ó 2, que comprende adicionalmente células miogénicas o cardiomiogénicas.

4. El implante bioactivo de la reivindicación 3, en el que las células se seleccionan del grupo que consiste en mioblastos esqueléticos, células del músculo liso, cardiomiocitos fetales y neonatales, cardiomiocitos ventriculares adultos, cardiosferas y progenitores epicárdicos.

5. El implante bioactivo de la reivindicación 1 ó 2, que comprende adicionalmente células angiogénicas.

6. El implante bioactivo de la reivindicación 5, en el que las células se seleccionan del grupo que consiste en una fracción de células de la médula ósea y de células mononucleares de sangre periférica, células progenitoras endoteliales de la médula ósea y de sangre periférica, células endoteliales, células mesoteliales del omento, células madre derivadas de adipocitos, células madre de tejido adiposo epicárdico, y células estrómicas multipotentes de sangre menstrual.

7. El implante bioactivo de la reivindicación 1 ó 2, en el que la membrana de armazón microporosa elastomérica se trata en la superficie para injertar moléculas de adhesión seleccionadas del grupo que consiste en péptidos funcionales tales como péptidos RGD, azúcares o lípidos funcionales, y proteínas tales como laminina o fragmentos de laminina.

8. El implante bioactivo de la reivindicación 1 ó 2, en el que el armazón de hidrogel nanoporoso o de nanofibras es un polímero natural seleccionado del grupo que consiste en colágeno, alginato, quitosano, péptido autoensamblador, ácido hialurónico o fibrina. El gel de polímero natural llena completamente los poros de la membrana elastomérica, o forma una capa que recubre las superficies internas de los poros de la membrana.

9. El implante bioactivo de la reivindicación 1 ó 2, en el que la composición del implante bioactivo tiene un porcentaje de polímero no degradable frente a degradable que oscila de 10% en peso a 48% en peso.

10. El implante bioactivo de la reivindicación 1 ó 2, que comprende adicionalmente electrodos de estimulación para la electroestimulación simultánea o tratamientos electrofisiológicos tales como desfibrilación y resincronización.

11. El implante bioactivo de la reivindicación 1 ó 2, que comprende adicionalmente marcadores tales como colorantes, microesferas, radioisótopos, partículas de hierro, para evaluación de la biodegradación, integración, proliferación, diferenciación y/o función, usando métodos radiológicos, ecocardiográficos de ultrasonidos, radioisotópicos, metabólicos, RMI, de barrido CT o bioluminiscentes-fluorescentes.

12. El implante bioactivo de la reivindicación 1 ó 2, que comprende adicionalmente un sistema para la liberación o absorción controlada de moléculas activas seleccionadas del grupo que consiste en pequeñas moléculas orgánicas, péptidos, lípidos, azúcares, proteínas, proteoglicanos que tienen actividad angiogénica, antiangiogénica,

prorregenerativa, antirregenerativa, apoptótica, necrótica, antiapoptótica y antinecrótica, tales como VEGF, IL-6, IL-10, IGF-1, FGF-2, HBEGF y bFGF.

13. El implante bioactivo de la reivindicación 1 ó 2, que comprende adicionalmente citocinas y péptidos antiapoptóticos angiogénicos.
- 5 14. El implante bioactivo de la reivindicación 1 ó 2, que tiene bucles helicoidales de polímeros sintéticos bioestables no degradables para que el implante presente una forma cónica.
15. Un método para preparar el implante bioactivo de la reivindicación 3 ó 5, que comprende las siguientes etapas:
- una membrana de armazón microporosa elastomérica según la reivindicación 1 se llena con un armazón de hidrogel de nanofibras peptídicas, para obtener un constructo bioactivo;
- 10 - dicho constructo se cultiva en condiciones mecánicas biofísicas.
16. El método de la reivindicación 15, que comprende adicionalmente sembrar o implantar células sobre o en dicho constructo bioactivo usando los siguientes métodos: mecánico (agitación, centrifugación), químicos (electroforesis), físicos (electroporación).
- 15 17. El método de la reivindicación 16, en el que dicho método se selecciona del grupo que consiste en agitación, centrifugación, electroforesis y electroporación.
18. Un método para preparar el implante bioactivo de la reivindicación 3 ó 5, que comprende las etapas de:
- a. obtener células miogénicas, cardiomiogénicas o angiogénicas;
 - b. cultivar dichas células in vitro;
 - c. mezclar dichas células con un armazón de hidrogel de nanofibras peptídicas;
- 20 d. llenar la membrana de armazón microporosa elastomérica según la reivindicación 1 con dicho armazón de hidrogel de nanofibras peptídicas de la etapa c, para obtener un constructo bioactivo.
19. Método según la reivindicación 18, que comprende además una etapa e, que es cultivar dicho constructo bioactivo bajo electroestimulación local in vitro.
20. El método de la reivindicación 18, en el que se usa tensión de oxígeno reducida durante la etapa b.
- 25 21. El método de la reivindicación 18, en el que el implante bioactivo se fabrica para ser adaptado al sostén y regeneración ventricular izquierdo y/o ventricular derecho, para envolturas ventriculares parciales completas.