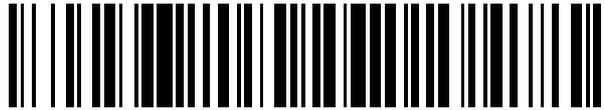


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 139**

51 Int. Cl.:

C12N 5/077 (2010.01)

A61K 35/34 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2006 E 11181797 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2015 EP 2431063**

54 Título: **Descelularización y recelularización de órganos y tejidos**

30 Prioridad:

26.08.2005 US 711501 P

19.06.2006 US 815242 P

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

02.10.2015

73 Titular/es:

**REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA
(100.0%)**

**1000 Westgate Drive, Suite 160
St. Paul, Minnesota 55114-8658, US**

72 Inventor/es:

**TAYLOR, DORRIS A. y
OTT, HARALD**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 547 139 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

Descelularización y recelularización de órganos y tejidos

CAMPO TÉCNICO

5 La presente invención se refiere a órganos y tejidos, y más concretamente a los métodos y materiales para descelularizar y recelularizar órganos y tejidos.

ANTECEDENTES

10 Se han desarrollado matrices obtenidas biológicamente para la ingeniería y regeneración tisular. No obstante, las matrices desarrolladas hasta la fecha tienen generalmente una estructura de matriz comprometida y/o no presentan un lecho vascular que permita la reconstitución efectiva del órgano o tejido. Esta divulgación describe métodos para la descelularización y recelularización de órganos y tejidos. WO03/043674 D5 divulga un órgano y un método para producir un órgano mediante perfusión de un órgano descelularizado con una población de células endoteliales.

RESUMEN

La presente invención se define por las reivindicaciones. La invención proporciona métodos para descelularizar un órgano o tejido, así como métodos para recelularizar un órgano o tejido descelularizado.

15 En un aspecto, la invención proporciona un corazón de mamífero descelularizado. Un corazón de mamífero descelularizado incluye una matriz extracelular descelularizada del corazón que tiene una superficie exterior. La matriz extracelular de un corazón descelularizado conserva sustancialmente la morfología de la matriz extracelular previa a la descelularización, y la superficie exterior de la matriz extracelular se encuentra sustancialmente intacta.

20 Algunos corazones representativos incluyen, a título meramente enunciativo, corazones de roedor, de cerdo, de conejo, de vacuno, de oveja o de canino. Otro corazón representativo es un corazón humano. El corazón descelularizado puede ser cadavérico. En alguna realización, el corazón descelularizado es una porción de un corazón entero. Por ejemplo, una porción de un corazón entero puede incluir, a título meramente enunciativo, un parche cardíaco, una válvula aórtica, una válvula mitral, una válvula pulmonar, una válvula tricúspide, un atrio derecho, un atrio izquierdo, un ventrículo derecho, un ventrículo izquierdo, un septo, una vasculatura coronaria, una arteria pulmonar o una vena pulmonar.

25 En otro aspecto, la invención proporciona un órgano sólido. Conforme a la descripción del presente, un órgano sólido incluye el corazón descelularizado anteriormente descrito y una población de células regenerativas unidas al mismo. En determinadas realizaciones, las células regenerativas son células pluripotentes. En algunas realizaciones, las células regenerativas son células madre embrionarias, células del cordón umbilical, células progenitoras o células madre obtenidas de adultos, células obtenidas de la médula espinal, células obtenidas de la sangre, células madre mesenquimales (MSC), células obtenidas de músculo esquelético, células progenitoras adultas multipotentes (MAPC), células madre cardíacas (CSC) o células madre adultas multipotentes obtenidas del corazón de origen no humano. En algunas realizaciones, las células regenerativas son fibroblastos cardíacos, células de la microvasculatura cardíaca o células endoteliales aórticas.

30 Por lo general, el número de células regenerativas unidas al corazón descelularizado son al menos unas 1.000. En algunas realizaciones, el número de células regenerativas unidas al corazón descelularizado es de unas 1.000 células/mg de tejido (peso en fresco, es decir, peso antes de la descelularización) a unos 10.000.000 de células/mg de tejido (peso en fresco). En algunas realizaciones, las células regenerativas son heterólogas a la parte descelularizada. Asimismo, en algunas realizaciones, el órgano sólido va a ser trasplantado a un paciente y las células regenerativas son autólogas al paciente.

40 En otro aspecto más, la invención proporciona un método *ex vivo* para hacer un órgano sólido. Por lo general, este método incluye proporcionar un corazón descelularizado como el descrito en el presente y poner en contacto el corazón descelularizado con una población de células regenerativas en condiciones en las que las células regenerativas se injertan, se multiplican y /o se diferencian dentro del corazón descelularizado y sobre el mismo. En una realización, las células regenerativas son inyectadas y perfundidas en el corazón descelularizado.

45 En otro aspecto más, la invención proporciona un método *ex vivo* para la descelularización de un corazón. Este método incluye proporcionar un corazón, canular el corazón en una o más cavidades, vasos y/o conductos para producir un corazón canulado, y perfundir el corazón canulado con un primer medio de disrupción celular a través de la canulación o canulaciones. Por ejemplo, la perfusión puede ser multidireccional desde cada cavidad, vaso y/o conducto canulado. Típicamente, el medio de disrupción celular comprende al menos un detergente, como SDS, PEG o Triton X.

Este método puede incluir también la perfusión del corazón canulado con un segundo medio de disrupción celular a través de las canulaciones. Por lo general, el primer medio de disrupción celular puede ser un detergente aniónico, como SDS, y el segundo medio de disrupción celular puede ser un detergente iónico, como Triton X. En estos métodos, la perfusión puede extenderse durante unas 2 a 12 horas por gramo (peso en fresco) de tejido cardíaco.

- 5 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente tienen el significado que normalmente entiende una persona con conocimientos en el campo al que pertenece la presente invención. A pesar de que en la práctica o para la comprobación de la presente invención se pueden emplear métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Por otra parte, los materiales, métodos y ejemplos se ofrecen únicamente a título ilustrativo y no pretenden establecer limitaciones.

10 En caso de conflicto, prevalecerá la presente especificación, incluyendo las definiciones.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se recogen en las ilustraciones adjuntas y en la descripción siguiente. Otras características, objetos y ventajas de la invención se pondrán de manifiesto en las ilustraciones y la descripción detallada, así como en las reivindicaciones.

15 DESCRIPCIÓN DE LAS ILUSTRACIONES

La Figura 1 es una muestra esquemática de la preparación inicial para la descelularización de un corazón. La aorta, la arteria pulmonar y la vena cava superior están canuladas (A, B, C, respectivamente) y la vena cava inferior, la arteria braquiocefálica, la arteria carótida común izquierda y la arteria subclavia izquierda están unidas. Las flechas indican la dirección de la perfusión en anterógrado y retrógrado.

- 20 La Figura 2 es un esquema de una realización de un aparato de descelularización / recelularización.

Los símbolos de referencia parecidos en las diversas ilustraciones indican elementos parecidos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

- 25 En general, los órganos sólidos tienen tres componentes principales: la matriz extracelular (ECM), las células que la integran y un lecho vascular. La descelularización de un órgano sólido aquí descrita elimina la mayoría o la totalidad de los componentes celulares, al tiempo que preserva sustancialmente la matriz extracelular (ECM) y el lecho vascular. Entonces se puede emplear un órgano sólido descelularizado como soporte para la recelularización. Los mamíferos de los que se pueden obtener órganos sólidos incluyen, a título meramente enunciativo, roedores, cerdos, conejos, vacuno, ovejas, perros y humanos. Los órganos y tejidos utilizados en los métodos aquí descritos pueden ser cadavéricos.

- 30 Los órganos sólidos a los que se hace referencia en el presente incluyen, a título meramente enunciativo, el corazón, el hígado, los pulmones, los músculos esqueléticos, el cerebro, el páncreas, el bazo, los riñones, el útero y la vejiga. Un órgano sólido utilizado en el presente se refiere a un órgano que tiene un sistema de vasculatura "sustancialmente cerrado". Un sistema de vasculatura "sustancialmente cerrado" con respecto a un órgano quiere decir que, tras la perfusión con un líquido, la mayoría del líquido está contenido en el órgano sólido y no se sale del mismo, dando por supuesto que los principales vasos están canulados, ligados o limitados de otro modo. A pesar de contar con un sistema de vasculatura "sustancialmente cerrado", muchos de los órganos sólidos anteriormente mencionados tienen vasos de "entrada" y "salida" definidos, que son útiles para introducir y mover el líquido por todo el órgano durante la perfusión.

- 35 Además de los órganos sólidos anteriormente descritos, se pueden descelularizar otros tipos de órganos o tejidos vascularizados como, por ejemplo, la totalidad o parte de las articulaciones (como rodillas, hombros o caderas), la tráquea o la médula espinal, empleando los métodos revelados en el presente documento. Un órgano o tejido descelularizado descrito en el presente documento (como el corazón o el hígado) o cualquier parte del mismo (por ejemplo, una válvula aórtica, una válvula mitral, una válvula pulmonar, una válvula tricúspide, una vena pulmonar, una arteria pulmonar, una vasculatura coronaria, un septo, un atrio derecho, un atrio izquierdo, un ventrículo derecho o un ventrículo izquierdo), con o sin recelularización, puede ser empleado para trasplantarlo a un paciente. Alternativamente, se puede utilizar un órgano o tejido recelularizado descrito en el presente para examinar, por ejemplo, células que experimentan una diferenciación y/o la organización celular de un órgano o tejido.

Descelularización de órganos o tejidos

La invención proporciona métodos para descelularizar *ex vivo* un órgano o tejido de mamífero. El paso inicial para la descelularización de un órgano o tejido consiste en canular el órgano o tejido. Los vasos, conductos y/o cavidades de un

órgano o tejido se pueden canular utilizando los métodos y materiales conocidos en el campo. El paso siguiente para descelularizar un órgano o tejido consiste en perfundir un medio de disrupción celular en el órgano o tejido canulado. La perfusión en un órgano puede ser multidireccional (por ejemplo, en anterógrado y retrógrado).

5 La perfusión de Langendorff en un corazón es un procedimiento rutinario en el campo, al igual que la perfusión fisiológica (también conocida como perfusión de modo de trabajo de cuatro cámaras). Véase, por ejemplo, Dehnert, *The Isolated Perfused Warm-Blooded Heart According to Langendorff*, In *Methods in Experimental Physiology and Pharmacology: Biological Measurement Techniques V*. Biomesstechnik-Verlag March GmbH, West Germany, 1988. En resumen, en la perfusión de Langendorff, se canula la aorta y se conecta a un depósito que contiene el medio de disrupción celular. El medio de disrupción celular se puede suministrar en dirección retrógrada por la aorta a un flujo constante, por ejemplo mediante una bomba de rodillos o de infusión o mediante una presión hidrostática constante. En 10 ambos ejemplos, se fuerza el cierre de las válvulas aórticas y el fluido de perfusión se dirige hacia los orificios coronarios (perfundiendo así toda la masa ventricular del corazón), que después pasa al atrio derecho a través del seno coronario. En la perfusión de modo de trabajo, se conecta una segunda cánula al atrio izquierdo y la perfusión se puede cambiar de flujo retrógrado a anterógrado.

15 En el campo se conocen los métodos para perfundir otros órganos o tejidos. A modo de ejemplo, las siguientes referencias describen la perfusión del pulmón, el hígado, el riñón, el cerebro y las extremidades. Van Putte et al., 2002, *Ann. Thorac. Surg.*, 74(3):893-8; den Butter et al., 1995, *Transpl. Int.*, 8:466-71; Firth et al., 1989, *Clin. Sci. (Lond.)*, 77(6):657-61; Mazzetti et al., 2004, *Brain Res.*, 999(1):81-90; Wagner et al., 2003, *J. Artif. Organs*, 6(3):183-91.

20 Se pueden utilizar uno o más medios de disrupción celular para descelularizar un órgano o tejido. Por lo general, un medio de disrupción celular incluye al menos un detergente, como SDS, PEG o Triton X. Un medio de disrupción celular puede incluir agua, de forma que el medio sea osmóticamente incompatible con las células. Alternativamente, un medio de disrupción celular puede incluir una solución tampón (p. ej., PBS) para la compatibilidad osmótica con las células. Los medios de disrupción celular pueden incluir también enzimas como, a título meramente enunciativo, una o más 25 colagenasas, una o más dispasas, una o más desoxirribonucleasas o una proteasa como la tripsina. En algunos casos, los medios de disrupción celular pueden incluir, adicional o alternativamente, inhibidores de una o más enzimas (p. ej., inhibidores de proteasa, inhibidores de nucleasa y/o inhibidores de colagenasa).

30 En determinadas realizaciones, se puede perfundir un órgano o tejido canulado secuencialmente con dos medios de disrupción celular diferentes. Por ejemplo, el primer medio de disrupción celular puede incluir un detergente aniónico, como SDS, y el segundo medio de disrupción celular puede incluir un detergente iónico, como Triton X. Tras la perfusión con al menos un medio de disrupción celular, se puede perfundir un órgano o tejido canulado, por ejemplo, con soluciones de lavado y/o soluciones que contienen una o más enzimas, como las reveladas en el presente documento.

35 Alternar la dirección de perfusión (por ejemplo, anterógrada y retrógrada) puede ayudar a descelularizar efectivamente la totalidad del órgano o tejido. La descelularización descrita en el presente descelulariza básicamente el órgano de dentro a fuera, provocando daños muy escasos a la ECM. Un órgano o tejido se puede descelularizar a una temperatura adecuada entre 4 y 40°C. Por lo general, dependiendo del tamaño y del peso de un órgano o tejido, así como del detergente o detergentes concretos y de su concentración en el medio de disrupción celular, el órgano o tejido se perfunde con el medio de disrupción celular entre 2 y 12 horas aproximadamente por gramo de órgano o tejido sólido. Incluyendo los lavados, un órgano se puede perfundir un máximo de entre 12 y 72 horas aproximadamente por gramo de tejido. Por lo general, la perfusión se ajusta a las condiciones fisiológicas, incluyendo el flujo pulsátil, la velocidad y la 40 presión.

45 Tal y como se indica en el presente, un órgano o tejido descelularizado consta esencialmente del componente de la matriz extracelular (ECM) de todas o la mayoría de las regiones de órgano o tejido, incluyendo los componentes de la ECM del árbol vascular. Los componentes de la ECM pueden incluir la totalidad o cualquiera de los siguientes componentes: fibronectina, fibrilina, laminina, elastina, miembros de la familia del colágeno (por ejemplo, colágeno I, III y IV), glicosaminoglicanos, sustancia básica, fibras reticulares y trombospondina, que pueden permanecer organizados como estructuras definidas, como la lámina basal. La descelularización con éxito se define como la ausencia de miofilamentos detectables, células endoteliales, células de músculo liso y los núcleos de las secciones histológicas empleando procedimientos de tinción histológica estándar. Preferiblemente, aunque no necesariamente, los restos de las células residuales también se han eliminado del órgano o tejido descelularizado.

50 Para recelularizar y generar efectivamente un órgano o tejido, es importante que la morfología y arquitectura de la ECM se mantenga (es decir, que permanezca sustancialmente intacta) durante y después del proceso de descelularización. El término "morfología" empleado en el presente se refiere a la forma general del órgano o tejido o de la ECM, mientras que "arquitectura" se refiere a la superficie exterior, la superficie interior y el EGM entre ellas.

55 La morfología y arquitectura de la ECM se puede examinar visual y/o histológicamente. Por ejemplo, la lámina basal de la superficie exterior de un órgano sólido o dentro de la vasculatura de un órgano o tejido no se debe eliminar ni dañar

de forma significativa como consecuencia de la descelularización. Por otra parte, las fibrillas de la ECM deben ser similares o mantenerse significativamente sin cambios con respecto a las de un órgano o tejido que no ha sido descelularizado.

5 Se puede aplicar uno o más compuestos a un órgano o tejido descelularizado para, por ejemplo, preservar el órgano descelularizado o para preparar el órgano o tejido descelularizado para la recelularización y/o asistir o estimular a las células durante el proceso de recelularización. Estos compuestos incluyen, a título meramente enunciativo, uno o más factores de crecimiento (p. ej., VEGF, DKK-1, FGF, BMP-1, BMP-4, SDF-1, IGF y HGF), agentes moduladores inmunológicos (p. ej., citocinas, glucocorticoides, antagonistas del receptor de IL-2, antagonistas de leucotrieno) y/o factores que modifican la cascada de coagulación (p. ej., aspirina, proteínas de unión a heparina y heparina). Por otra parte, un órgano o tejido descelularizado se puede tratar también, por ejemplo, con radiación (p. ej., UV, gamma) para reducir o eliminar la presencia de cualquier tipo de microorganismo que quede en un órgano o tejido descelularizado.

Recelularización de órganos o tejidos

15 La invención proporciona métodos *ex vivo* para generar un órgano o tejido. Un órgano o tejido se genera poniendo en contacto un órgano o tejido descelularizado como el aquí descrito con una población de células regenerativas. Las células regenerativas empleadas en el presente son cualesquiera células utilizadas para recelularizar un órgano o tejido descelularizado, salvo células embrionicas humanas. Las células regenerativas pueden ser células totipotentes, células pluripotentes o células multipotentes de origen no humano, y pueden ser no comprometidas o comprometidas. Las células regenerativas también pueden ser células de un único linaje. Por otra parte, las células regenerativas pueden ser células no diferenciadas, células parcialmente diferenciadas o células totalmente diferenciadas. Las células regenerativas utilizadas en el presente incluyen las células madre embrionicas no humanas (según la definición del Instituto Nacional de Salud estadounidense (NIH); véase, por ejemplo, el Glosario de www.stemcells.nih.gov). Las células regenerativas también incluyen células progenitoras, células precursoras y células madre obtenidas de adultos, incluyendo células del cordón umbilical y células madre fetales.

25 Algunos ejemplos de células regenerativas que se pueden utilizar para recelularizar un órgano o tejido incluyen, a título meramente enunciativo, células madre embrionicas no humanas, células sanguíneas del cordón umbilical, células madre o progenitoras obtenidas de tejido, células madre o progenitoras obtenidas de la médula espinal, células madre o progenitoras obtenidas de la sangre, células madre mesenquimales (MSC), células obtenidas de músculo esquelético o células progenitoras adultas multipotentes (MAPC) donde las células son células embrionicas no humanas. Otras células regenerativas que se pueden utilizar incluyen células madre del corazón (CSC), células madre adultas obtenidas del corazón, fibroblastos cardíacos, células endoteliales de la microvasculatura cardíaca o células endoteliales aórticas. También se pueden utilizar como células regenerativas las células madre obtenidas de la médula, como las células mononucleares de la médula espinal (BM-MNC), células madre o progenitoras vasculares o endoteliales, y células madre obtenidas de la sangre periférica, tales como las células progenitoras endoteliales (EPC).

35 El número de células regenerativas que se introduce en un órgano descelularizado para generar un órgano o tejido depende tanto del órgano (p. ej., el órgano del que se trata, su tamaño y peso) o tejido, como del tipo y de la fase de desarrollo de las células regenerativas. Los diferentes tipos de células pueden tener diferentes tendencias por lo que respecta a la densidad de población que alcanzarán dichas células. De forma similar, los diferentes órganos o tejidos pueden ser celularizados a diferentes densidades. A modo de ejemplo, un órgano o tejido descelularizado puede ser "sembrado" con, al menos, unas 1.000 (p. ej., al menos 10.000, 100.000, 1.000.000, 10.000.000 o 100.000.000) células regenerativas; o puede tener entre unas 1.000 células/mg de tejido (peso en fresco, es decir antes de la descelularización) y unas 10.000.000 células/mg de tejido (peso en fresco) adheridas.

45 Las células regenerativas pueden ser introducidas ("sembradas") en un órgano o tejido descelularizado mediante la inyección en uno o más lugares. Por otra parte, se puede introducir más de un tipo de célula (es decir, un cóctel de células) en un órgano o tejido descelularizado. Por ejemplo, se puede inyectar un cóctel de células en múltiples posiciones de un órgano o tejido descelularizado o se pueden inyectar diferentes tipos de células en diferentes partes de un órgano o tejido descelularizado. Alternativa o adicionalmente a la inyección, se pueden introducir células regenerativas o un cóctel de células mediante perfusión en un órgano o tejido descelularizado canulado. Por ejemplo, las células regenerativas se pueden perfundir en un órgano descelularizado utilizando un medio de perfusión, que posteriormente se puede cambiar a un medio de expansión y/o diferenciación para inducir el crecimiento y/o la diferenciación de las células regenerativas.

55 Durante la recelularización, un órgano o tejido se mantiene en condiciones en las que al menos algunas de las células regenerativas se pueden multiplicar y/o diferenciar dentro del órgano o tejido descelularizado o sobre el mismo. Estas condiciones incluyen, a título meramente enunciativo, las condiciones adecuadas de temperatura y/o presión, actividad mecánica y/o eléctrica, fuerza, la cantidad oportuna de O₂ y/o CO₂, humedad, y condiciones estériles o casi estériles. Durante la recelularización, el órgano o tejido descelularizado y las células regenerativas adheridas al mismo se mantienen en un entorno adecuado. Por ejemplo, las células regenerativas pueden precisar un suplemento nutricional

(p. ej., nutrientes y/o una fuente de carbono, como glucosa), hormonas exógenas o factores de crecimiento y/o un determinado pH.

5 Las células regenerativas pueden ser alogénicas de un órgano o tejido descclularizado (p. ej., un órgano o tejido humano descclularizado sembrado con células regenerativas humanas) o las células regenerativas pueden ser xenogénicas de un órgano o tejido descclularizado (p. ej., un órgano o tejido de cerdo descclularizado sembrado con células regenerativas humanas). El término "alogénico" empleado en el presente se refiere a las células obtenidas de la misma especie que originó el órgano o tejido (p. ej., individuos emparentados o no emparentados), mientras que "xenogénico" se refiere a células obtenidas de una especie diferente a la que originó el órgano o tejido.

10 En algunos casos, un órgano o tejido generado por los métodos aquí descritos se trasplantará a un paciente. En esos casos, las células regenerativas utilizadas para recelularizar un órgano o tejido descclularizado se pueden obtener del paciente, de forma que las células regenerativas sean "autólogas" del paciente. Las células regenerativas de un paciente se pueden obtener, por ejemplo, de la sangre, la médula espinal, los tejidos u órganos en diferentes etapas de la vida (p. ej., prenatalmente, neonatalmente o perinatalmente, durante la adolescencia o como adulto), empleando métodos conocidos en el campo. Alternativamente, las células regenerativas empleadas para recelularizar un órgano o
15 tejido descclularizado pueden ser singénicas (es decir, de un gemelo idéntico) del paciente, las células regenerativas pueden ser células con el mismo antígeno leucocitario humano (HLA) de, por ejemplo, un pariente del paciente o un individuo con el mismo antígeno leucocitario humano (HLA) no relacionado con el paciente, o las células regenerativas pueden ser alogénicas del paciente de, por ejemplo, un donante que no tenga el mismo antígeno leucocitario humano (HLA).

20 Independientemente de la fuente de las células regenerativas (p. ej., autólogas o no), el órgano sólido descclularizado puede ser autólogo, alogénico o xenogénico de un paciente.

25 En determinados casos, un órgano descclularizado puede ser recelularizado con células *in vivo* (p. ej., después de que el órgano o tejido haya sido trasplantado a un individuo). La recelularización *in vivo* se puede realizar como se ha descrito anteriormente (p. ej., inyección y/o perfusión) con, por ejemplo, cualquiera de las células regenerativas aquí descritas. Alternativa o adicionalmente, la siembra *in vivo* de un órgano o tejido descclularizado con células endógenas puede ocurrir naturalmente o estar mediada por factores suministrados al tejido recelularizado.

30 El progreso de las células regenerativas se puede controlar durante la recelularización. Por ejemplo, el número de células en un órgano o tejido se puede evaluar realizando una biopsia en uno o más puntos temporales durante la recelularización. Por otra parte, la cantidad de diferenciación a la que se han sometido las células regenerativas se puede controlar determinando si hay presentes o no diversos marcadores en una células o una población de células. Los marcadores asociados con diferentes tipos de células y en diferentes etapas de la diferenciación para esos tipos de células son conocidos en el campo y se pueden detectar fácilmente utilizando anticuerpos e inmunoensayos estándar. Véase, por ejemplo, *Current Protocols in Immunology*, 2005, Coligan et al., Eds., John Wiley & Sons, capítulos 3 y 11.
35 Para controlar la recelularización se pueden emplear ensayos de ácido nucleico, así como una evaluación morfológica y/o histológica.

Sistema controlado para la descclularización y/o recelularización de un órgano o tejido

40 La revelación también proporciona un sistema (p. ej., un biorreactor) para la descclularización y/o recelularización de un órgano o tejido. Por lo general, este sistema incluye al menos un dispositivo de canulación para la canulación de un órgano o tejido, un aparato de perfusión para la perfusión del órgano o tejido a través de la cánula o cánulas, y medios (p. ej., un sistema de contención) para mantener un entorno estéril para el órgano o tejido. La canulación y perfusión son técnicas bien conocidas en el campo. Por lo general, un dispositivo de canulación incluye tubos huecos de un tamaño apropiado para introducirlos en un vaso, conducto y/o cavidad de un órgano o tejido. Típicamente, se canulan uno o más vasos, conductos y/o cavidades en un órgano. Un aparato de perfusión puede incluir un depósito de contención para el líquido (p. ej., un medio de disrupción celular) y un mecanismo para mover el líquido por el órgano (p. ej., una bomba, la presión del aire, la gravedad) a través de la cánula o cánulas. La esterilidad de un órgano o tejido durante la descclularización y/o recelularización se puede mantener utilizando diversas técnicas conocidas en el campo, tales como el control y filtrado del flujo de aire, y la perfusión, por ejemplo, con antibióticos, antifúngicos y otros antimicrobianos, para evitar el crecimiento de microorganismos no deseados.

50 Un sistema para descclularizar y recelularizar los órganos y tejidos aquí descritos puede poseer la capacidad para controlar determinadas características de perfusión (p. ej., presión, volumen, patrón de flujo, temperatura, gases, pH), fuerzas mecánicas (p. ej., tensión y movimiento de la pared ventricular) y estimulación eléctrica (p. ej., ritmo). Dado que el lecho vascular coronario cambia durante el curso de la descclularización y recelularización (p. ej., resistencia vascular, volumen), un aparato de perfusión regulado por presión es beneficioso para evitar grandes fluctuaciones. La efectividad de la perfusión se puede evaluar en el efluente y en secciones del tejido. El volumen de perfusión, el patrón de flujo, la temperatura, las presiones parciales de O₂ y CO₂ y el pH se pueden controlar empleando métodos estándar.
55

Se pueden emplear sensores para controlar el sistema (p. ej., biorreactor) y/o el órgano o tejido. Se puede utilizar la sonomicrometría, micromanometría y/o mediciones de la conductancia para adquirir información sobre presión-volumen o el trabajo sistólico recopilable antes de la carga, con respecto al movimiento de la pared miocárdica y el desempeño. Por ejemplo, se pueden emplear sensores para controlar la presión de un líquido que se mueve a través de un órgano o tejido canulado; la temperatura ambiente del sistema y/o la temperatura del órgano o tejido; el pH y/o la velocidad de flujo de un líquido que se mueve a través del órgano o tejido canulado; y/o la actividad biológica de un órgano o tejido recelularizado. Además de tener sensores para controlar estas características, un sistema para la descelularización y/o recelularización de un órgano o tejido también puede incluir medios para mantener o ajustar estas características. Entre los medios para mantener o ajustar estas características se pueden incluir componentes como un termómetro, un termostato, electrodos, sensores de presión, válvulas de descarga, válvulas para cambiar la velocidad de flujo de un líquido, válvulas para abrir y cerrar las conexiones del fluido en las soluciones empleadas para cambiar el pH de una solución, un balón, un marcapasos externo y/o una cámara flexible. Para ayudar a garantizar unas condiciones estables (p. ej., temperatura), las cámaras, depósitos y tubos pueden ser con camisa de agua.

Puede ser beneficioso durante la recelularización colocar una carga mecánica sobre el órgano y las células adheridas al mismo. Como ejemplo, un balón insertado en el ventrículo izquierdo a través del atrio izquierdo se puede utilizar para emplazar una tensión mecánica sobre un corazón. Se puede conectar al balón una bomba de pistón que permite el ajuste del volumen y la velocidad, a fin de simular la tensión y el movimiento de la pared ventricular izquierda. Para controlar la tensión y el movimiento de la pared, se pueden medir la presión y el movimiento de la pared ventricular izquierda utilizando la micromanometría y/o sonomicrometría. En algunas realizaciones, se puede conectar un marcapasos externo a una bomba de pistón, para proporcionar una estimulación sincronizada con cada pérdida de aire del balón ventricular (que es equivalente a la sístole). Se puede registrar el ECG periférico en la superficie del corazón para permitir el ajuste del voltaje del ritmo, el control de la depolarización y repolarización, y para proporcionar un mapa de superficie simplificado de la recelularización o el corazón recelularizado.

La distensión ventricular mecánica también se puede conseguir conectando una bomba peristáltica a una cánula insertada en el ventrículo izquierdo a través del atrio izquierdo. De forma similar al procedimiento anteriormente descrito con un balón, la distensión ventricular conseguida mediante el movimiento del fluido periódico (p. ej., flujo pulsátil) a través de la cánula se puede sincronizar con estimulación eléctrica.

Utilizando los métodos y materiales aquí revelados, se puede descelularizar y recelularizar un corazón de mamífero y, cuando se mantiene en las condiciones apropiadas, se puede generar un corazón funcional que se somete a la función contráctil y responde a estímulos del ritmo y/o a agentes farmacológicos. Este corazón funcional recelularizado se puede trasplantar a un mamífero y funcionar durante un período de tiempo.

La Figura 2 muestra un sistema para descelularizar y/o recelularizar un órgano o tejido (p. ej., un biorreactor) de acuerdo con la revelación. El biorreactor es para descelularizar y recelularizar un corazón. Tiene una bomba peristáltica de volumen y velocidad ajustables (A); una bomba de pistón de volumen y velocidad ajustables conectada a un balón intraventricular (B); un marcador externo de amplitud, frecuencia y voltaje ajustables (C); un electrocardiógrafo (D); un sensor de presión en la "línea arterial" (que iguala la presión de la arteria coronaria) (E); un sensor de presión en la línea "venosa" (que iguala la presión del seno coronario) (F); y sincronización entre el marcapasos y la bomba de pistón (G).

Un sistema para generar un órgano o tejido se puede controlar mediante un soporte magnético en combinación con un procesador programable (p. ej., un soporte magnético utilizado en el presente tiene instrucciones almacenadas para hacer que un procesador programable siga determinados pasos). Por ejemplo, este soporte magnético, en combinación con un procesador programable, puede recibir y procesar información de uno o más de los sensores. Este soporte magnético en conjunción con un procesador programable también puede transmitir información e instrucciones de vuelta al biorreactor y/o al órgano o tejido.

Un órgano o tejido que se somete a la recelularización se puede controlar para comprobar si presenta actividad biológica. La actividad biológica puede ser la del órgano o tejido en sí, como la actividad eléctrica, la actividad mecánica, la presión mecánica, contractilidad y/o la tensión de la pared del órgano o tejido. Por otra parte, la actividad biológica de las células adheridas al órgano o tejido puede ser controlada, por ejemplo, para comprobar la actividad de intercambio/transporte de iones, la división celular y/o la viabilidad celular. Véase, por ejemplo, Laboratory Textbook of Anatomy and Physiology (2001, Wood, Prentice Hall) y Current Protocols in Cell Biology (2001, Bonifacino et al., Eds, John Wiley & Sons). Como se ha debatido anteriormente, puede ser útil estimular una carga activa sobre un órgano durante la recelularización. Un soporte magnético de la revelación, en combinación con un procesador programable, se puede utilizar para coordinar los componentes necesarios para controlar y mantener una carga activa sobre un órgano o tejido.

El peso de un órgano o tejido se puede introducir en un soporte magnético aquí descrito, que, en combinación con un procesador programable, puede calcular los tiempos de exposición y las presiones de perfusión para ese determinado órgano o tejido. Este soporte magnético puede registrar precarga y poscarga (la presión anterior y posterior a la

perfusión, respectivamente) y la velocidad de flujo. Un soporte magnético en combinación con un procesador programable puede ajustar la presión de perfusión, la dirección de perfusión y/o el tipo de solución de perfusión a través de uno o más controles de las bombas y/o válvulas.

- 5 De acuerdo con la presente invención, se puede emplear la biología molecular convencional, microbiología, bioquímica y técnicas de biología celular convencionales en el campo. Estas técnicas se explican íntegramente en la bibliografía. La invención se describirá también en los siguientes ejemplos, que no limitan el ámbito de aplicación de la invención descrita en las reivindicaciones.

EJEMPLOS

10 Sección A. Descelularización (Parte I)

Ejemplo 1—Preparación de un órgano sólido para la descelularización

Para evitar la formación de trombos *post mortem*, una rata donante fue sistemáticamente heparinizada con 400 U de heparina/kg de donante. Después de la heparinización, el corazón y los principales vasos adyacentes fueron cuidadosamente retirados.

- 15 El corazón se colocó en una solución salina fisiológica (0,9%) que contenía heparina 2000 U/ml) y se mantuvo a 5°C hasta su posterior procesamiento. En condiciones estériles, se retiró el tejido conectivo del corazón y los principales vasos. La vena cava inferior y las venas pulmonares izquierda y derecha se unieron distalmente desde el atrio derecho e izquierdo utilizando ligaduras monofilamento no reabsorbibles.

Ejemplo 2—Canulación y perfusión de un órgano sólido

- 20 El corazón se montó en un aparato de descelularización para la perfusión (Figura 1). La arteria torácica descendente fue canulada para permitir la perfusión coronaria retrógrada (Figura 1, Cánula A). Se unieron las ramas de la arteria torácica (p. ej., tronco braquiocefálico, arteria carótida común izquierda, arteria subclavia izquierda). La arteria pulmonar fue canulada antes de su división en la arteria pulmonar izquierda y derecha (Figura 1, Cánula B). La vena cava superior fue canulada (Figura 1, Cánula C). Esta configuración permite la perfusión coronaria tanto retrógrada como anterógrada.
- 25 Cuando se aplicó presión positiva a la cánula aórtica (A), la perfusión se produjo desde las arterias coronarias a través del lecho capilar por el sistema venoso coronario hasta el atrio derecho y la vena cava superior (C). Cuando se aplicó presión positiva a la cánula de la vena cava superior (C), la perfusión se produjo desde el atrio derecho, el seno coronario y las venas coronarias a través del lecho capilar a las arterias coronarias y la cánula aórtica (A).

30 Ejemplo 3—Descelularización

Después de montar el corazón en el aparato de descelularización, la perfusión anterógrada se comenzó con una solución tampón fosfato libre de calcio, heparinizada y fría, que contenía 1-5 mmol de adenosina por L de perfusato para restablecer un flujo coronario constante. El flujo coronario se evaluó midiendo el flujo y la presión de la perfusión coronaria, y calculando la resistencia coronaria. Después de 15 minutos de flujo coronario estable, se inició el proceso de descelularización basado en detergente.

- 35 Los detalles de los procedimientos se describen a continuación. No obstante, en resumen, se perfundió un corazón en anterógrado con un detergente. Después de la perfusión, el corazón se puede lavar con una solución tampón (p. ej., PBS) en retrógrado. El corazón se perfundió con PBS que contenía antibióticos y después con PBS que contenía desoxirribonucleasa I. El corazón fue entonces perfundido con cloruro de benzalconio al 1% para reducir la contaminación microbiana y evitar la futura contaminación microbiana, y posteriormente perfundido con PBS para lavar el órgano de cualquier resto de componentes celulares, enzimas o detergente.

Ejemplo A – Descelularización de corazones cadavéricos de rata

- 45 Se aislaron los corazones de ocho ratas desnudas macho (250-300 g). Inmediatamente después de la disección, se canuló el arco aórtico y se perfundieron los corazones en retrógrado con el detergente indicado. Los cuatro diferentes protocolos de descelularización a base de detergente (véase debajo) se compararon con respecto a su viabilidad y eficacia para (a) eliminar los componentes celulares y (b) preservar estructuras vasculares.

Por lo general, la descclularización incluía los pasos siguientes: estabilización del órgano sólido, descclularización del órgano sólido, renaturalización y/o neutralización del órgano sólido, lavado del órgano sólido, degradación de cualquier ADN restante sobre el órgano, desinfección del órgano y homeostasis del órgano.

A) Protocolo de descclularización n.º 1 (PEG)

5 Los corazones se lavaron en 200 ml de PBS que contenía 100 U/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomocina y 0,25 ug/ml de anfotericina B sin recirculación. Los corazones fueron entonces descclularizados con 35 ml de polietilenglicol (PEG; 1 g/ml) durante hasta 30 minutos con recirculación manual. El órgano se lavó después con 500 ml de PBS durante hasta 24 horas, utilizando una bomba para la recirculación. El paso de lavado se repitió al menos dos veces durante al menos 24 horas cada vez. Los corazones se expusieron a 35 ml de desoxirribonucleasa I (70 U/ml) durante al menos una hora con recirculación manual. Los órganos se lavaron de nuevo con 500 ml de PBS durante al menos 24 horas.

B) Protocolo de descclularización n.º 2 (Triton X y tripsina)

15 Los corazones se lavaron en 200 ml de PBS que contenía 100 U/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomocina y 0,25 ug/ml de anfotericina B durante al menos 20 minutos sin recirculación. Los corazones fueron entonces descclularizados con tripsina al 0,05% durante 30 minutos, seguida de una perfusión con 500 ml de PBS que contenía Triton-X al 5% e hidróxido de amonio al 0,1% durante unas seis horas. Los corazones fueron entonces perfundidos con agua desionizada durante una hora aproximadamente y, a continuación, perfundidos con PBS durante 12 horas. Los corazones se lavaron después tres veces durante 24 horas cada vez con 500 ml de PBS utilizando una bomba para la recirculación. Los corazones se perfundieron con 35 ml de desoxirribonucleasa I (70 U/ml) durante una hora con recirculación manual y se lavaron dos veces con 500 ml de PBS durante al menos unas 24 horas cada vez, utilizando una bomba para la recirculación.

C) Protocolo de descclularización n.º 3 (SDS al 1%)

25 Los corazones se lavaron en 200 ml de PBS que contenía 100 U/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomocina y 0,25 ug/ml de anfotericina B durante al menos 20 minutos sin recirculación. Los corazones fueron descclularizados con 500 ml de agua que contenían SDS al 1% durante al menos unas seis horas, utilizando una bomba para la recirculación. Entonces se lavaron los corazones con agua desionizada durante aproximadamente una hora y después con PBS durante unas 12 horas. Los corazones se lavaron tres veces con 500 ml de PBS durante al menos unas 24 horas cada vez, utilizando una bomba para la recirculación. Los corazones se perfundieron después con 35 ml de desoxirribonucleasa I (70 U/ml) durante aproximadamente una hora con recirculación manual y se lavaron tres veces con 500 ml de PBS durante al menos unas 24 horas cada vez, utilizando una bomba para la recirculación.

D) Protocolo de descclularización n.º 4 (Triton X)

35 Los corazones se lavaron con 200 ml de PBS que contenía 100 U/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomocina y 0,25 ug/ml de anfotericina B durante al menos 20 minutos sin recirculación. Los corazones se descclularizaron entonces con 500 ml de agua que contenía Triton X al 5% e hidróxido de amonio al 0,1%, durante al menos seis horas, empleando una bomba para la recirculación. Entonces se perfundieron los corazones con agua desionizada durante aproximadamente una hora y después con PBS durante unas 12 horas. Los corazones se lavaron mediante perfusión con 500 ml de PBS tres veces durante al menos unas 24 horas cada vez, utilizando una bomba para la recirculación. Los corazones se perfundieron después con 35 ml de desoxirribonucleasa I (70 U/ml) durante aproximadamente una hora con recirculación manual y se lavaron tres veces con 500 ml de PBS durante unas 24 horas cada vez.

40 Para los experimentos iniciales, el aparato de descclularización se colocó dentro de una cámara de flujo laminar. Los corazones se perfundieron a una presión de perfusión coronaria de 60 cm de H₂O. A pesar de que no era necesario, los corazones descritos en los anteriores experimentos se montaron en una cámara de descclularización y se sumergieron por completo y perfundieron con PBS que contenía antibióticos durante 72 horas en modo recirculación, a un flujo continuo de 5 ml/min, para lavar la mayor cantidad posible de componentes celulares y detergente.

45 La descclularización satisfactoria se definió como la falta de miofilamentos y núcleos en las secciones histológicas. La preservación con éxito de las estructuras vasculares se evaluó mediante la perfusión con Evans Blue al 2%, antes de integrar las secciones de tejido.

50 La descclularización altamente eficiente tuvo lugar cuando el corazón se perfundió primero, en anterógrado, con un detergente iónico (dodecilsulfato sódico (SDS) al 1%, aproximadamente 0,03 M) disuelto en H₂O desionizada a una presión de perfusión coronaria constante y posteriormente se perfundió, en anterógrado, con un detergente no iónico (Tritón X-100 al 1%) para eliminar el SDS y presumiblemente para renaturalizar las proteínas de la matriz extracelular

(ECM). Intermitentemente, el corazón fue perfundido, en retrógrado, con una solución tampón fosfato para despejar los capilares obstruidos y los vasos pequeños.

Ejemplo 5 – Evaluación de los órganos descelularizados

5 Para probar las estructuras vasculares intactas tras la descelularización, se tiñe un corazón descelularizado a través de una perfusión de Langendorff con Evans Blue, para teñir la membrana basal vascular y cuantificar la densidad macro y microvascular. Por otra parte, las partículas de poliestireno se pueden perfundir en un corazón y a través del mismo para cuantificar el volumen coronario, el nivel de rotura de los vasos y evaluar la distribución de la perfusión, analizando el efluente coronario y las secciones de tejido. Una combinación de tres criterios se evalúa y compara con el corazón no descelularizado aislado: 1) una distribución uniforme de partículas de poliestireno, 2) un cambio significativo en la
10 filtración en algún nivel, 3) la densidad microvascular.

La orientación de las fibras se evalúa mediante la técnica de microscopia de luz polarizada de Tower et al. (2002, Fiber alignment imaging during mechanical testing of soft tissues, Ann BiomedEng., 30(10):1221-33), que se puede aplicar en tiempo real a una muestra sometida a una tensión uniaxial o biaxial. Durante la perfusión de Langendorff, se registran las propiedades mecánicas básicas de la ECM descelularizada (cumplimiento, elasticidad, presión de rotura) y en comparación con corazones recién aislados.
15

Sección B. Descelularización (Parte II)

Ejemplo 1 – Descelularización de un corazón de rata

Se anestesiaron ratas Fischer F344 macho de 12 semanas (Harlan Labs, PO Box 29176 Indianapolis, IN 46229), utilizando una inyección intraperitoneal de 100 mg/kg de ketamina (Phoenix Pharmaceutical, Inc., St. Joseph, MO) y 10 mg/kg de xilacina (Phoenix Pharmaceutical, Inc., St. Joseph, MO). Tras la heparinización sistémica (American Pharmaceutical Partners, Inc., Schaumburg, XL) a través de la vena femoral izquierda, se realizó una esternotomía media y se abrió el pericardio. Se retiró la grasa retroesternal, se diseccionó la aorta torácica ascendente y se ligaron sus ramas. Las venas cava y pulmonar, la arteria pulmonar y la aorta torácica fueron transeccionadas y el corazón se retiró del pecho. Se insertó una cánula aórtica de 1,8 mm precargada (Radnoti Glass, Monrovia, CA) en la aorta ascendente para permitir la perfusión coronaria en retrógrado (Langendorff). Los corazones fueron perfundidos con PBS heparinizada (Hyclone, Logan, UT) que contenía 10 μ M de adenosina a una presión de perfusión coronaria de 75 cm de H₂O durante 15 minutos y, a continuación, con dodecilsulfato sódico (SDS) al 1% o glicol polietileno 1000 al 1% (PEG 1000) (EMD Biosciences, La Jolla, Germany) o Triton-X 100 al 1% (Sigma, St. Louis, MO) en agua desionizada durante 2 - 15 horas. A continuación se realizó una perfusión con agua desionizada durante 15 minutos y una perfusión de Triton-X al 1% (Sigma, St. Louis, MO) en agua desionizada durante 30 minutos. Los corazones se perfundieron entonces constantemente con PBS que contenía antibiótico (100 U/ml de penicilina G (Gibco, Carlsbad, CA), 100 U/ml de estreptomina (Gibco, Carlsbad, CA) y 0,25 μ g/ml de anfotericina B (Sigma, St. Louis, MO)) durante 124 horas.
20
25
30

Después de 420 minutos de perfusión en retrógrado con PEG al 1%, Tritón-X 100 al 1% o SDS al 1%, PEG y Triton-X 100, la perfusión indujo una apariencia opaca y edematosa, mientras que la perfusión con SDS resultó en un cambio más drástico provocando un injerto prácticamente traslúcido, dado que los elementos opacos se lavaron lentamente. Los corazones expuestos a los tres protocolos se mantuvieron en gran medida intactos, sin ninguna evidencia de ruptura coronaria o insuficiencia de la válvula aórtica a través del protocolo de perfusión (a una presión de perfusión coronaria constante de 77,4 mmHg). El flujo coronario descendió en los tres protocolos durante los 60 primeros minutos de perfusión; después se normalizó durante la perfusión con SDS, mientras que se mantuvo aumentado en la perfusión con Triton-X 100 y PEG. La perfusión con SDS indujo el incremento inicial más elevado de la resistencia coronaria calculada (hasta 250 mmHg.s.ml⁻¹), seguida del Triton-X (hasta 200 mmHg.s.ml⁻¹) y PEG (hasta 150 mmHg.s.ml⁻¹).
35
40

Utilizando secciones histológicas del tejido cardíaco perfundido con detergente, se determinó que la descelularización durante el período de tiempo observado fue incompleta en los corazones tratados tanto con PEG como con Triton-X; la tinción con hematoxilina-eosina (H&E) mostró los núcleos y los filamentos de estrías transversales. En contraste, ningún núcleo ni filamentos contráctiles fueron detectables en las secciones de los corazones perfundidos con SDS. No obstante, las estructuras vasculares y la dirección de las fibras de la ECM se preservaron en los corazones tratados con SDS.
45

Para retirar la SDS iónica de la ECM tras la descelularización inicial, el órgano fue perfundido durante 30 minutos con Triton-X 100. Por otra parte, y para garantizar el lavado completo de todos los detergentes y restablecer un pH fisiológico, el órgano descelularizado fue perfundido extensivamente con agua desionizada y PBS durante 124 horas.
50

Ejemplo 2 – Descelularización de un riñón de rata

Para el aislamiento del riñón, todo el contenido peritoneal se envolvió en una gasa húmeda y se apartó con cuidado hacia un lado para exponer el espacio retroperitoneal. Los vasos mesentéricos se unieron y transeccionaron. La aorta abdominal fue unida y transeccionada por debajo del despegue de las arterias renales. La aorta torácica se transeccionó justo por encima del diafragma y se canuló utilizando una cánula aórtica de 1,8 mm (Radnoti Glass, Monrovia, CA). Los riñones se retiraron cuidadosamente del retroperitoneo y se sumergieron en PBS estéril (Hyclone, Logan, UT) para minimizar la fuerza de tracción sobre las arterias renales. Quince minutos de perfusión de PBS heparinizada a los que siguieron 2-16 horas de perfusión con SDS al 1% (Invitrogen, Carlsbad, CA) en agua desionizada y 30 minutos de perfusión con Triton-X al 1% (Sigma, St. Louis, MO) en agua desionizada. El hígado se perfundió entonces constantemente con PBS que contenía antibiótico (100 U/ml de penicilina G (Gibco, Carlsbad, CA), 100 U/ml de estreptomycin (Gibco, Carlsbad, CA) y 0,25 µg/ml de anfotericina B (Sigma, St. Louis, MO)) durante 124 horas.

Una perfusión de 420 minutos con SDS seguida de Tritón-X 100 generó un soporte de ECM renal completamente descelularizado con una arquitectura del órgano y la vasculatura intacta. La perfusión con Evans blue confirmó una vasculatura intacta similar a la de la ECM cardiaca descelularizada. La tinción con pentacromo Movat de la corteza renal descelularizada mostró glomerulos intactos y membranas basales tubulares convolutas proximales y distales, sin núcleos ni células intactas. La tinción de la médula renal descelularizada mostró membranas basales de los conductos de recogida y tubulares intactas. La SEM de la corteza renal descelularizada confirmó membranas basales tubulares y glomerulares intactas. Las estructuras características, como la cápsula de Bowman, que delinean los glomerulos con respecto a las membranas basales capilares glomerulares y los túbulos proximales y distales dentro del glomerulo fueron preservadas. Las imágenes de la SEM de la médula renal descelularizada mostraron pirámides medulares intactas llegando a la pelvis renal con las membranas basales de los conductos de recogida intactas avanzando hacia la papila. Por tanto, todas las ultraestructuras principales del riñón estaban intactas después de la descelularización.

Ejemplo 3 – Descelularización de un pulmón de rata

El pulmón (con la tráquea) fue retirado cuidadosamente del pecho y se sumergió en PBS estéril (Hyclone, Logan, UT) para minimizar la fuerza de tracción sobre las arterias pulmonares. Quince minutos de perfusión de PBS heparinizada estuvieron seguidos por 2-12 horas de perfusión con SDS al 1% (Invitrogen, Carlsbad, CA) en agua desionizada y 15 minutos de perfusión con Triton-X al 1% (Sigma, St. Louis, MO) en agua desionizada. El pulmón se perfundió entonces constantemente con PBS que contenía antibiótico (100 U/ml de penicilina G (Gibco, Carlsbad, CA), 100 U/ml de estreptomycin (Gibco, Carlsbad, CA) y 0,25 µg/ml de anfotericina B (Sigma, St. Louis, MO)) durante 124 horas.

Una perfusión de 180 minutos con SDS seguida de Tritón-X 100 generó un soporte de ECM pulmonar completamente descelularizado con las vías aéreas y vasos intactos. La tinción con pentacromo Movat de las secciones histológicas mostró la presencia de componentes de la ECM en el pulmón, incluyendo las principales proteínas estructurales, como el colágeno y la elastina, y también elementos solubles como los proteoglicanos. No obstante, no se conservó ningún núcleo ni células intactas. Las vías aéreas se preservaron del bronquio principal al bronquiolo pulmonar hasta los bronquiolos respiratorios, los conductos alveolares y los alveolos. El lecho vascular de las arterias pulmonares hacia el nivel capilar y las venas pulmonares se mantuvo intacto. Los micrógrafos de SEM del pulmón descelularizado mostraron unas membranas basales vasculares, alveolares y bronquiales preservadas, sin ningún signo de células retenidas. La malla de fibras reticulares y elásticas que proporciona el principal soporte estructural al septo interalveolar, así como la membrana basal septal se mantuvieron intactas, incluyendo la densa red de capilares del intersticio pulmonar.

Los micrógrafos de SEM de la traquea descelularizada mostraron una arquitectura de ECM intacta con anillos de cartílago hialino descelularizados y una membrana basal luminal irregular sin epitelio respiratorio.

Ejemplo 4 – Descelularización de un hígado de rata

Para el aislamiento del hígado, se expuso la vena cava a través de una laparotomía media, se diseccionó y canuló utilizando una cánula aórtica de ratón (Radnoti Glass, Monrovia, CA). La vena y la arteria hepática y el conducto biliar fueron transeccionados y el hígado fue cuidadosamente retirado del abdomen y sumergido en PBS estéril (Hyclone, Logan, UT) para minimizar la fuerza de tracción sobre la vena porta. Quince minutos de perfusión de PBS heparinizada estuvieron seguidos por 2-12 horas de perfusión con SDS al 1% (Invitrogen, Carlsbad, CA) en agua desionizada y 15 minutos de perfusión con Triton-X al 1% (Sigma, St. Louis, MO) en agua desionizada. El hígado se perfundió entonces constantemente con PBS que contenía antibiótico (100 U/ml de penicilina G (Gibco, Carlsbad, CA), 100 U/ml de estreptomycin (Gibco, Carlsbad, CA) y 0,25 µg/ml de anfotericina B (Sigma, St. Louis, MO)) durante 124 horas.

Una perfusión con SDS durante 120 minutos seguida de una perfusión con Triton-X 100 fueron suficientes para generar un hígado completamente descelularizado. La tinción con pentacromo Movat del hígado descelularizado confirmó la retención de la organización hepática característica con la vena central y el espacio porta conteniendo la arteria hepática, el conducto biliar y la vena porta.

Ejemplo 5—Métodos y materiales empleados para evaluar los órganos descelularizados

Histología e inmunofluorescencia. La tinción con pentacromo Movat se realizó con tejidos descelularizados integrados en parafina siguiendo las instrucciones de los fabricantes (American Mastertech Scientific, Lodi, CA). En resumen, las láminas desparafinizadas se tiñeron utilizando la tinción elástica de Verhoeff, se enjuagaron, se diferenciaron en cloruro férrico al 2%, en enjuagaron, se colocaron en tiosulfato sódico al 5%, se aclararon, se bloquearon en ácido acético glacial al 3%, se tiñeron en solución de azul alcian al 1%, se enjuagaron, se tiñeron con croceína escarlata – fucsina ácida, se enjuagaron, se bañaron en ácido acético glacial al 1%, se decoloraron en ácido fosfotúngstico al 5%, se bañaron en ácido acético glacial al 1%, se deshidrataron, se colocaron en una solución de alcohol de azafrán, se deshidrataron, se montaron y se cubrieron.

La tinción de inmunofluorescencia se realizó con células descelularizadas. La recuperación del antígeno se realizó en tejido integrado en parafina (tejido recelularizado), pero no en secciones congeladas (tejido descelularizado), como sigue: Se retiró la cera de las secciones de la parafina y se rehidrataron mediante dos cambios de xileno durante cinco minutos cada uno, seguido de un gradiente de alcohol secuencial y un enjuague en agua corriente fría. Las láminas se colocaron después en una solución de recuperación de antígeno (2,94 g de citrato trisódico, 22 ml de 0,2 M de solución de ácido hidroclicórico, 978 ml de agua ultrapura, y se ajustó a un pH de 6.0) y se hirieron durante 30 minutos. Tras el enjuague con agua corriente fría durante 10 minutos, comenzó la inmunotinción. Las secciones congeladas se fijaron con paraformaldehído al 4% (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) en IX PBS (Mediatech, Herndon, VA) durante 15 minutos a temperatura ambiente, antes de la tinción. Las láminas se bloquearon con suero bovino fetal al 4% (FBS; HyClone, Logan, UT) en IX PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se incubaron secuencialmente durante una hora a temperatura ambiente con anticuerpos (Ab) primarios y secundarios diluidos. Entre cada paso, las láminas se lavaron tres veces (5-10 minutos cada vez) con IX PBS. El Ab primario frente a colágeno I (IgG policlonal de cabra (Cat. N° sc-8788), Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA), colágeno III (IgG policlonal de cabra (Cat. N° sc-2405), Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA), fibronectina (IgG policlonal de cabra (Cat. N° sc-6953), Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA), y laminina (IgG policlonal de conejo (Cat. n° sc-20142), Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) se emplearon a una dilución de 1:40 con tampón de bloqueo. La ficoeritrina bovina contra IgG de cabra del Ab secundario (Cat. N° sc-3747, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) y ficoeritrina bovina contra IgG de ratón (Cat. N° sc-3750, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) se utilizaron a una dilución de 1:80 con tampón de bloqueo. Las láminas se cubrieron con cubreobjetos (Fisherbrand 22 x 60, Pittsburgh, PA) en un medio de montaje de endurecimiento que contenía 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) (Vectashield, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA). Las imágenes se registraron utilizando ImagePro Plus 4.5.1 (Mediacybernetics, Silver Spring, MD) en un microscopio invertido Nikon Eclipse TE200 (Fryer Co. Inc., Huntley, JLL) empleando ImagePro Plus 4.5.1 (Mediacybernetics, Silver Spring, MD).

Microscopia electrónica de barrido. Los tejidos normales y descelularizados fueron fijados por perfusión con glutaraldehído al 2,5% (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) en 0,1 M de solución tampón de cacodilato (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) durante 15 minutos. Los tejidos fueron entonces enjuagados dos veces en 0,1 M de solución tampón de cacodilato durante 15 minutos. La post-fijación se realizó con tetróxido de osmio al 1% (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) durante 60 minutos. Las muestras de tejido fueron deshidratadas entonces con concentraciones crecientes de EtOH (al 50% durante 10 minutos, al 70% durante 10 minutos dos veces, al 80% durante 10 minutos, al 95% durante 10 minutos dos veces, al 100% durante 10 minutos dos veces). Las muestras de tejido se sometieron entonces a un secado de punto crítico en un Tousimis Samdri-780A (Tousimis, Rockville, MD). El revestimiento se realizó con 30 segundos de revestimiento pulverizado de oro/paladio en el evaporador de vacío Denton DV-502A Vacuum Evaporator (Denton Vacuum, Moorestown, NJ). Las imágenes de la microscopía de electrones de barrido se tomaron utilizando un microscopio de electrones de barrido Hitachi S4700 Field Emission Scanning Electron Microscope (Hitachi High Technologies America, Pleasanton, CA).

Pruebas mecánicas. Se cortaron cruces de tejido miocárdico desde el ventrículo izquierdo de las ratas, de forma que la zona central era aproximadamente de 5 mm x 5 mm y los ejes de la cruz estaban alineados en dirección circunferencial y longitudinal al corazón. El grosor inicial de las cruces de tejido se midió mediante un micrómetro y se averiguó que eran de $3,59 \pm 0,14$ mm en el centro de la cruz del tejido. Las cruces también se cortaron desde el tejido ventricular izquierdo descelularizado de la rata en la misma orientación y con el mismo tamaño en la zona central. El grosor inicial de las muestras descelularizadas fue de $238,5 \pm 38,9$ μ m. Por otra parte, se probaron las propiedades mecánicas de los geles de fibrina, otro soporte de ingeniería de tejidos utilizado para aplicar técnicas al tejido vascular y cardíaco. Los geles de fibrina se vertieron en moldes en forma de cruz con una concentración final de 6,6 mg de fibrina/ml. El grosor medio de los geles de fibrina era de $165,2 \pm 67,3$ μ m. Todas las muestras se fijaron a la máquina de pruebas mecánicas biaxial (Instron Corporation, Norwood, MA) mediante pinzas, se sumergieron en PBS, y se estiraron de forma equibiaxial a una deformación del 40%. Para probar las propiedades mecánicas pasivas estáticas con precisión, las muestras se estiraron en incrementos de deformación del 4% y se dejaron relajar en cada valor de tensión durante al menos 60 segundos. Las fuerzas fueron convertidas para diseñar la tensión, normalizando los valores de fuerza con la zona transversal en la dirección del eje específico (5 mm x grosor inicial). La tensión de ingeniería se calculó como el

desplazamiento normalizado por la longitud inicial. A fin de comparar los datos entre los dos ejes, así como entre grupos separados, se calculó un módulo tangencial como sigue:

$$[T(\epsilon = 40\% \text{ deformación}) - T(\epsilon = 36\% \text{ tensión})] / 4\% \text{ deformación}$$

5 Donde T es la tensión de ingeniería y ϵ es la deformación de ingeniería. Los valores para el módulo tangencial fueron promediados y comparados entre los dos ejes (circunferencial y longitudinal), así como entre grupos.

Ejemplo 6 – Evaluación de la biocompatibilidad de un órgano descelularizado

10 Para evaluar la biocompatibilidad, se sembraron 100.000 células madre embrionarias de ratón (mESC) suspendidas en 1 cc de medio de expansión estándar (Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Gibco, Carlsbad, CA), suero bovino fetal al 10% (HyClone, Logan, UT), 100 U/ml de penicilina G (Gibco, Carlsbad, CA), 100 U/ml de estreptomina (Gibco, Carlsbad, CA), 2 mmol/L.L-glutamina (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0,1 mmol/L 2-mercaptoetanol (Gibco, Carlsbad, CA) en las secciones de la ECM y sobre placas de control sin una estimulación específica del factor de crecimiento ni el apoyo de células sustentadoras. Se añadió 4', 6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) al medio de cultivo celular a una concentración de 10 μ /ml para etiquetar los núcleos celulares y permitir la cuantificación de la unión y expansión celular. Las imágenes se registraron bajo luz UV y con contraste de fase en el punto de referencia, a las 24, 48, y 72 horas, utilizando ImagePro Plus 4.5.1 (Mediacybernetics, Silver Spring, MD) en un microscopio invertido Nikon Eclipse TE200 (Fryer Co. Inc., Huntley, EL).

15 La ECM descelularizada era compatible con la viabilidad, unión y proliferación celular. Las mESC sembradas se injertaron en los soportes de la ECM y comenzaron a invadir la matriz en el plazo de 72 horas a partir del sembrado de las células.

Ejemplo 7 – Evaluación de los órganos descelularizados

20 La competencia e integridad de la válvula aórtica del lecho vascular coronario del corazón de rata descelularizado con SDS fue evaluado mediante perfusión de Langendorff con tinción Evans azul al 2%. No se observó ningún llenado de tinte en el ventrículo izquierdo, lo que indica que la válvula aórtica estaba intacta. Macroscópicamente, el llenado de las arterias coronarias hasta el cuarto punto de ramificación se confirmó sin signos de fuga de tinte. En las secciones de tejido, la perfusión de las grandes (150 μ m) y las pequeñas (20 μ m) arterias y venas se confirmó posteriormente mediante fluorescencia roja de la membrana basal vascular teñida con Evans azul.

30 Para confirmar la retención de los principales componentes de la ECM cardiaca, se procedió a la tinción inmunofluorescente de los soportes de la ECM descelularizada con SDS. Esto confirmó la presencia de los principales componentes de la ECM cardiaca, tales como colágenos I y m, fibronectina y laminina, aunque no se demostró ninguna prueba de elementos contráctiles ni núcleos intactos retenidos, incluyendo la cadena pesada de la miosina cardiaca o la alfa-actina sarcomérica.

35 Los micrógrafos de electrones de barrido (SEM) de la ECM cardiaca descelularizada con SDS demostraron que la composición y orientación de las fibras se habían preservado en la pared aórtica y en la hojuela de la válvula aórtica, con ausencia de células en todo el grosor del tejido. La pared ventricular izquierda y derecha descelularizada conservó la composición de las fibras de la ECM (tejidos, puntales, bovinas) y orientación, mientras que las miofibras se eliminaron por completo. Dentro de la ECM retenida de los dos ventrículos, se observaron membranas basales vasculares intactas de diferentes diámetros sin células de músculos lisos ni endoteliales. Por otra parte, se conservó una fina capa de fibras epicardiales densas bajo una lámina basal epicardial intacta.

40 Para valorar las propiedades mecánicas del tejido cardíaco descelularizado, se realizaron pruebas biaxiales y se compararon con los geles de fibrina, que se utilizan con frecuencia como soporte artificial de la ECM en la ingeniería de tejidos cardíacos. El ventrículo de rata normal y las muestras descelularizadas fueron altamente anisotrópicos con respecto a la conducta de tensión-deformación. Por el contrario, en la muestra de gel de fibrina, las propiedades de tensión-deformación eran extremadamente similares entre las dos direcciones principales. La dependencia direccional de la conducta de tensión-deformación estuvo presente en todas las muestras del ventrículo de rata normal y los grupos descelularizados, y la naturaleza isotrópica de las propiedades de tensión-deformación fue la típica de todas las muestras del grupo del gel de fibrina.

50 A fin de comparar las propiedades de tensión-deformación entre estos dos grupos y también entre los ejes principales de los corazones, se calculó un módulo tangencial a una deformación del 40% (véase el Ejemplo 5 para consultar la ecuación), tanto en dirección circunferencial como longitudinal. Cabe señalar que, en ambas direcciones, el grupo de la muestra descelularizada tuvo un módulo significativamente superior que el ventrículo de rata normal y los grupos de muestras del gel de fibrina. No obstante, hubo una diferencia significativa entre los módulos en las dos direcciones, tanto en el ventrículo de rata normal como en la matriz descelularizada, aunque no en el gel de fibrina.

Para el tejido ventricular izquierdo intacto, la tensión a una deformación del 40% variaba entre 5 y 14 kPa en la dirección longitudinal y entre 15 y 24 kPa en dirección circunferencial, lo que concuerda con los datos publicados anteriormente. Tanto en el tejido ventricular de rata como en el tejido ventricular de rata descelularizado, la dirección circunferencial se vio más afectada que la dirección longitudinal, debido probablemente a la orientación de las fibras musculares del corazón. A pesar de los cambios en la orientación de las fibras a través del grosor del tejido cardíaco, la mayoría de las fibras estaban orientadas en dirección circunferencial y, por tanto, cabría esperar que esta dirección fuese más rígida. El tejido descelularizado era notablemente más rígido que el tejido intacto. También cabría esperar esto, dado que la matriz extracelular es más rígida que las propias células y la combinación de ECM y células probablemente no sería tan rígida como la ECM sola. A pesar de que los valores del módulo tangencial del tejido descelularizado parecen bastante hinchados, solamente son ligeramente superiores a los valores del módulo de Young para la elastina purificada (aproximadamente 600 kPa) e inferiores al módulo de Young de una única fibra de colágeno (5 Mpa), lo que sitúa los valores determinados en el presente dentro de un rango razonable.

Ejemplo 8 – Descelularización de otros órganos o tejidos

Además del corazón, pulmón, riñón e hígado de rata, se generaron resultados similares aplicando el protocolo de descelularización por perfusión aquí descrito al músculo esquelético, el páncreas, el intestino grueso y delgado, el esófago, el estómago, el bazo, el cerebro, la médula espinal y el hueso.

Ejemplo 9 – Descelularización de un riñón de cerdo

Se aislaron riñones de cerdo de animales macho heparinizados. Para permitir la perfusión de los órganos aislados, la arteria renal fue canulada y se lavó la sangre con una perfusión de PBS durante 15 minutos. La perfusión con 27 L de SDS al 1% en agua desionizada se realizó durante 35,5 horas, a una presión de 50-100 mmHg. La perfusión con Triton-X al 1% en agua desionizada se inició para eliminar la SDS del soporte de la ECM. Entonces se procedió al lavado y la aplicación de la solución tampón en los riñones descelularizados, mediante una perfusión con PBS que contenía antibiótico, durante 120 horas, para eliminar los detergentes y obtener un pH biocompatible.

Se observó la limpieza del órgano dos horas después de iniciar la perfusión. El color blanco puro predominaba tras 12 horas de perfusión. La descelularización se terminó con el órgano blanco semitransparente.

Ejemplo 10 de la revelación – trasplante de un corazón descelularizado

Se prepararon los corazones de ratas F344 mediante canulación de la aorta distal a la válvula Ao y uniendo todos los demás vasos principales y vasos pulmonares, salvo la rama izquierda del tronco pulmonar (distal a su bifurcación) y la vena cava inferior (IVC). La descelularización se consiguió utilizando la perfusión coronaria de Langendorff en retrógrado y dos litros de SDS al 1% durante 12-16 horas. Los corazones fueron entonces renaturalizados con 35 mL de Triton-X al 1% durante 30-40 minutos, y después lavados con PBS que contenía antibióticos y antifúngicos durante 72 horas. La IVC se ligó antes del trasplante.

Se preparó una rata RNU grande (380 a 400 gramos) para la recepción del corazón descelularizado. Se aplicó una pinza de mosquito con ángulos romos tanto a la IVC como a la Ao abdominal del animal huésped, para garantizar el aislamiento de las zonas de anastomosis. La aorta del corazón descelularizado fue sometida a anastomosis con la aorta abdominal huésped proximal e inferior a las ramas renales, utilizando una sutura de seda de 8-0. La rama izquierda del tronco pulmonar del corazón descelularizado fue sometida a anastomosis con la región más cercana de la IVC huésped, para minimizar la tensión física sobre el tronco pulmonar.

Después de que ambos vasos fuesen cosidos en el animal huésped, se retiró la pinza y se llenó el corazón descelularizado con la sangre del animal huésped. Se observó visualmente la presión aórtica abdominal del animal receptor en el corazón descelularizado y la aorta. El corazón descelularizado se mostró distendido y rojo por la sangre. La hemorragia fue mínima en el punto de la anastomosis. Se administró heparina tres minutos después de la liberación de la pinza (inicio de perfusión) y se fotografió y posicionó el corazón en el abdomen para minimizar la tensión sobre los sitios de anastomosis. Se cerró el abdomen de forma estéril y se controló al animal durante la recuperación. A las 55 horas del trasplante, el animal fue sometido a eutanasia y el corazón descelularizado fue recuperado para la observación. Los animales que no recibieron heparina mostraron una importante trombosis en la LV tras la disección y evaluación. También se observó sangre en las arterias coronarias, tanto en el lado derecho como izquierdo del corazón.

En otros experimentos de trasplante, la pinza fue liberada después de que ambos vasos hubiesen sido cosidos en el animal huésped y el corazón descelularizado hubiese sido llenado con sangre del animal huésped. Se observó visualmente la presión aórtica abdominal del animal receptor en el corazón descelularizado y la aorta. El corazón descelularizado se mostró distendido y rojo, y la hemorragia fue mínima en el punto de la anastomosis. Se administró heparina (3000 IU) mediante inyección IP, tres minutos después de la liberación de la pinza (inicio de perfusión). Se fotografió y posicionó el corazón en el abdomen para minimizar la tensión sobre los puntos de anastomosis. Se cerró el

abdomen de forma estéril y se controló al animal durante la recuperación. El animal fue encontrado muerto por una hemorragia, aproximadamente 48 horas después del trasplante. El tiempo de trasplante oscila actualmente en un rango de entre 55 y 70 minutos.

Sección C. Recelularización

5 Ejemplo 1 – Recelularización de las láminas de ECM cardiaca

Para evaluar la biocompatibilidad de la ECM descelularizada, se cultivaron láminas de 1 mm de grosor de un corazón descelularizado con líneas celulares endoteliales y miogénicas. Se sembraron 2 x 10⁶ mioblastos esqueléticos de rata, mioblastos de ratón C2C12, células endoteliales del cordón umbilical humano (HUVEC) y células endoteliales pulmonares bovinas (BPEC) en las secciones de tejido y se cultivaron juntos en condiciones estándar durante siete días. Las células miogénicas migraron y se expandieron dentro de la ECM y se alinearon con la orientación original de las fibras. Estas células miogénicas demostraron una proliferación aumentada y repoblaron por completo grandes porciones de la lámina de ECM. Las líneas de células endoteliales demostraron un patrón de crecimiento menos invasivo, formando una monocapa sobre la superficie del injerto. No se produjo ningún efecto antiproliferativo detectable en estas condiciones.

15 Ejemplo 2 – Recelularización de la ECM cardiaca mediante perfusión coronaria

Para determinar la eficiencia del sembrado de células regenerativas en una ECM cardiaca descelularizada mediante perfusión coronaria, se transfirió un corazón descelularizado a una cámara de órganos y se perfundió de forma constante con un medio de cultivo de células oxigenadas en condiciones de cultivo celular (CO₂ al 5%, humedad al 60%, 37°C). Se infundieron 120 x 10⁶ PKH HUVEC etiquetadas (suspendidas en 50 ml de medio de crecimiento de células endoteliales) a una presión de perfusión coronaria de 40 cm H₂O. El efluente coronario se guardó y se contaron las células. El efluente fue entonces recirculado y perfundido de nuevo, para obtener un número máximo de células. La recirculación se repitió dos veces. Tras el tercer paso, aproximadamente 90 x 10⁶ células se mantuvieron en el corazón. El corazón se perfundió constantemente con 500 ml de medio de cultivo de células endoteliales oxigenadas en recirculación durante 120 horas. El corazón fue entonces extraído e integrado para el crioseccionamiento. Las HUVEC se confinaron a los residuos arteriales y venosos por todo el corazón, pero no se dispersaron completamente por toda la ECM extravascular.

25 Ejemplo 3 – Recelularización de un corazón de rata descelularizado con células cardíacas de rata neonata

Aislamiento y preparación de los cardiocitos neonatales de rata. El día uno, entre ocho y diez ratas neonatas SPF Fisher-344, de entre uno y tres días (Harlan Labs, Indianapolis, EN) fueron sedadas con isoflurano inhalado al 5% (Abbott Laboratories, North Chicago, IL), rociadas con EtOH al 70% y se realizó una rápida esternotomía en condiciones estériles. Los corazones fueron seccionados y colocados de inmediato en un tubo cónico de 50 ml sobre HBSS que contenía hielo; Reactivo n.º 1 de un sistema de aislamiento de cardiomiocitos neonatales (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ). Se retiró el supernatante y los corazones completos fueron lavados una vez con HBSS frío, agitando energicamente. Los corazones fueron transferidos a una placa de cultivo de 100 mm que contenía 5 ml de HBSS frío, se retiró el tejido conectivo, y el tejido restante se separó en partes de <1 mm². Se añadió más HBSS para conseguir un volumen de placa total de 9 ml, al que se añadió 1 ml de tripsina (Reactivo n.º 2, kit de Worthington) para conseguir una concentración final de 50 µg/ml. Las placas se incubaron durante la noche en un refrigerador a 5°C.

El día dos, se retiraron las placas del refrigerador y se colocaron en una cámara estéril sobre hielo. El tejido y el tampón que contenía tripsina fueron transferidos a tubos cónicos de 50 ml sobre hielo, utilizando pipetas de boca ancha. El inhibidor de tripsina (Reactivo n.º 3) fue reconstituido con 1 ml de HBSS (Reactivo n.º 1) y añadido al tubo cónico de 50 ml, donde se mezcló con suavidad. El tejido fue oxigenado durante 60-90 segundos, pasando aire sobre la superficie del líquido. El tejido fue después calentado a 37°C y se añadió lentamente la colagenasa (300 unidades/ml) reconstituida con 5 ml de Leibovitz L-15. El tejido se colocó en un agitador caliente (37°C) durante 45 minutos. A continuación, el tejido fue titulado diez veces, utilizando una pipeta de 10 ml para liberar las células (3 mls por segundo), para después pasar por un filtro de 0,22 µm. El tejido fue lavado con otros 5 ml de medio L-15, titulado una segunda vez y recogido en el mismo tubo cónico de 50 ml. La solución de células fue después incubada a temperatura ambiente durante 20 minutos y rociada a 50 xg durante cinco minutos para granular las células. Se retiró con suavidad el supernatante y las células fueron resuspendidas en el volumen deseado utilizando el medio de cardiomiocitos neonatales.

50 Medios y soluciones. Todos los medios fueron filtrados en condiciones estériles y almacenados en un lugar oscuro en refrigeradores a 5°C. El kit de Worthington Isolation contiene un medio sugerido, Leibovitz L-15, para el cultivo. Este medio se utilizó para el Día Dos del procesamiento del tejido solamente. Para las placas se empleó un medio alternativo que contenía calcio, que se describe en el presente. Medio Leibovitz L-15 de Worthington: El polvo del medio de Leibovitz se reconstituyó utilizando 1 L de agua de grado de cultivo celular. El medio L-15 de Leibovitz contiene 140

mg/ml de CaCl, 93,68 mg/ml de MgCl, y 97,67 mg/ml de MgS. Medio de cardiomiocitos neonatales: El medio de Iscove's Modified Dulbecco (Gibco, Cat. nº 12440-053) se complementó con suero bovino fetal al 10% (HyClone), 100 U/ml de penicilina G (Gibco), 100 U/ml de estreptomycin (Gibco), 2 mmol/L de L-glutamina (Invitrogen), y 0,1 mmol/L 2-mercaptoetanol (Gibco, Cat. Nº 21985-023), y se filtró en condiciones estériles antes de la utilización. Se añadió la anfotericina B necesaria (0,25 µg/ml de concentración final). El medio fue mejorado con 1,2 mM de CaCl (Fisher Scientific, Cat. Nº C614-500) y 0,8 mM de MgCl (Sigma, Cat. Nº M-0250).

Análisis del cultivo *in vitro* de la recelularización. Como paso para la creación de un corazón bioartificial, la ECM aislada fue recelularizada con células obtenidas de un corazón neonato. Los corazones completamente descelularizados (obtenidos como se ha descrito en el presente) fueron inyectados con una combinación de 50×10^6 células de músculos lisos, células endoteliales, fibrocitos y cardiomiocitos recién aislados de ratas neonatales. El tejido cardíaco fue después laminado y las láminas se cultivaron *in vitro* para probar la biocompatibilidad de la ECM descelularizada y la capacidad de las estructuras resultantes para convertirse en anillos miocárdicos.

Dentro de los anillos resultantes se observaron contracciones mínimas microscópicamente después de 24 horas, lo que demuestra que las células trasplantadas eran capaces de unirse e integrarse en la ECM descelularizada. Microscópicamente, las células se orientaron a lo largo de la dirección de la fibra de la ECM. La tinción por inmunofluorescencia confirmó la supervivencia y la integración de los cardiomiocitos que expresan la cadena pesada de miosina cardíaca. En el plazo de cuatro días, se observaron grupos de manchas de células en contracción en la matriz descelularizada, que progresaban hacia los anillos de tejido en contracción sincrona hacia el día ocho.

El día 10 estos anillos fueron montados entre dos barras para medir la fuerza contráctil bajo diferentes condiciones de precarga. Los anillos podían ser acelerados eléctricamente hasta una frecuencia de 4 Hz y creaban una fuerza contráctil de hasta 3 mN bajo una precarga de hasta 0,65 g. Así, con este planteamiento de cultivo de tejido *in vitro* para la recelularización, se obtuvo un tejido contráctil que generó una fuerza igual de efectiva que la generada por los anillos de tejido cardíaco modificados y optimizados que utilizan estructuras de ECM artificiales.

Recelularización de un corazón descelularizado mediante perfusión Los soportes recelularizados (50×10^6 células de músculos lisos, células endoteliales, fibrocitos y cardiomiocitos recién aislados de ratas neonatales) fueron montados en un biorreactor perfundible (n=10) que simulaba la fisiología cardíaca de la rata, incluyendo una distensión ventricular izquierda pulsátil con precarga y postcarga gradualmente ascendente (día 1: precarga 4-12 mmHg, postcarga 3-7 mmHg), flujo coronario pulsátil (día 1: 7 ml/min), y estimulación eléctrica (día 2: 1 Hz) en condiciones de cultivo de tejido cardíaco estéril (5% CO₂, 60% H₂O, 37°C). El cultivo del órgano perfundido se mantuvo entre una y cuatro semanas. Las presiones, los flujos y EKG se registraron durante 30 segundos cada 15 minutos, durante todo el período de cultivo. Los vídeos de los corazones bioartificiales nacientes se registraron en los días cuatro, seis y diez, tras la siembra de las células.

Transcurridos 10 días desde la siembra de las células, se realizó una evaluación funcional más profunda, incluyendo la inserción de una sonda de presión en el ventrículo izquierdo para registrar la presión ventricular izquierda (LVP) y un vídeo para registrar el movimiento de la pared cuando la frecuencia de estimulación se aumentaba gradualmente de 0,1 Hz a 10 Hz, y se realizó una estimulación farmacológica con fenilefrina (PE). El corazón recelularizado mostró una respuesta contráctil a los ritmos sencillos con contracciones espontáneas tras las contracciones rítmicas con los correspondientes aumentos de la LVP. Tras un ritmo sencillo, el corazón mostró tres contracciones espontáneas y después pasó a un estado fibrilatorio. De forma similar a las contracciones estimuladas, las despolarizaciones espontáneas provocaron un correspondiente aumento de la LVP y un complejo QRS registrable, lo que indica posiblemente la formación de un patrón de conducción estable en desarrollo.

Una vez que se incrementó la frecuencia de estimulación hasta los 0,4 Hz, se produjo una media de dos contracciones espontáneas después de cada contracción inducida; a una frecuencia de ritmo de hasta 1 Hz, solamente se produjo una contracción espontánea; y a una frecuencia de ritmo de 5 Hz, no se produjo ninguna contracción espontánea. El ritmo de captura máximo fue de 5 Hz, lo que es coherente con un período refractario de 250 ms para el miocardio maduro. Tras la perfusión con 100 µM de PE, se produjeron despolarizaciones espontáneas regulares a una frecuencia de 1,7 Mz, unidas a los correspondientes aumentos de la LVP.

El análisis histológico en el día 10 reveló una dispersión celular y una integración en todo el grosor de la pared ventricular izquierda (0,5-1,2 mm). Los cardiomiocitos se alinearon con la dirección de la fibra ventricular y formaron áreas de densos injertos organizados que recordaban a un miocardio maduro, así como injertos inmaduros menos densos, similares al miocardio en desarrollo. La tinción de inmunofluorescencia para la cadena pesada de miosina cardíaca confirmó el fenotipo de cardiomiocito. Se mantuvo una elevada densidad capilar en todo el miocardio recién desarrollado, con una distancia media entre capilares de unos 20 µm, que es similar a la reportada en un miocardio de rata madura. El fenotipo de célula endotelial se confirmó mediante tinción inmunofluorescente con el Factor de vonWillbrand (vWF). La viabilidad celular se mantuvo en todo el grosor del injerto, lo que indica el nivel de oxígeno y el suministro de nutrientes suficientes a través de la perfusión coronaria.

REIVINDICACIONES

1. Un método *ex vivo* de descelularización de un órgano de mamífero o un tejido vascularizado de mamífero, que comprende:
- 5 proporcionar un órgano de mamífero que posee una matriz extracelular y un lecho vascular sustancialmente cerrado y células integradas en la matriz extracelular, o proporcionar un tejido vascularizado de mamífero que tiene una matriz extracelular y un árbol vascular y células integradas en la matriz extracelular;
- canular dicho órgano o tejido en uno o más vasos y/o conductos, produciendo así un órgano o tejido canulado; y
- 10 perfundir la vasculatura de dicho órgano o tejido vascularizado canulado con un primer medio de disrupción celular, a través de dichas una o más canulaciones.
2. El método de la reivindicación 1, en donde esencialmente la totalidad del lecho vascular es contactado con el primer medio de disrupción celular.
3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho órgano de mamífero es un corazón, un riñón, un hígado, un bazo, un páncreas, vejiga, músculo esquelético, intestino delgado, intestino grueso, estómago, hueso, cerebro o un pulmón.
- 15 4. El método de la reivindicación 1, en donde dicha perfusión es multidireccional desde cada vaso y/o conducto canulado, particularmente comprende adicionalmente perfundir dicho órgano canulado con un segundo medio de disrupción celular, a través de dicha una o más canulaciones, particularmente en donde dicho segundo medio de disrupción celular comprende DNasa.
- 20 5. El método de la reivindicación 1, en donde dicha perfusión se prolonga aproximadamente entre 2 y 12 horas por gramo de tejido del órgano.
6. Un órgano de mamífero descelularizado o tejido de mamífero vascularizado, que comprende una matriz extracelular descelularizada de dicho órgano o tejido, en donde dicha matriz extracelular comprende una superficie exterior y en donde dicha matriz extracelular, incluyendo el lecho o árbol vascular, conserva sustancialmente la morfología de dicha matriz extracelular previa a la descelularización, y en donde dicha superficie exterior se mantiene sustancialmente intacta, en donde dicho órgano o tejido se puede obtener por el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5,
- 25 y donde el órgano es un bazo; un páncreas; un pulmón; un riñón porcino, bovino, de oveja, canino o humano; o un hígado porcino, bovino, de oveja, canino o humano.
- 30 7. El tejido descelularizado de la reivindicación 6, en donde dicho tejido es cadavérico o en donde dicho tejido es médula espinal, tráquea o una articulación o una porción de ellos.
8. Una porción de un órgano de mamífero descelularizado, que comprende:
- una matriz extracelular descelularizada de dicha porción, en donde dicha matriz extracelular comprende una superficie exterior y en donde dicha matriz extracelular, incluyendo el árbol vascular, conserva sustancialmente la morfología de dicha matriz extracelular antes de la descelularización, en donde dicha superficie exterior está sustancialmente intacta y en donde dicha porción se puede obtener por el método descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 35 9. Un método *ex vivo* para producir un órgano o una porción vascularizada de un órgano o tejido, que comprende:
- proporcionar una perfusión de un órgano de mamífero descelularizado, una perfusión de una porción vascularizada descelularizada de un órgano de mamífero o una perfusión de un tejido de mamífero vascularizado descelularizado de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8; y
- 40 a) contactar dicho órgano, porción o tejido descelularizado con una población de células regenerativas en condiciones en las que dichas células regenerativas se injerten, multipliquen y/o diferencien dentro de dicho órgano, porción o tejido descelularizado, en donde las células son células embrionarias de origen no humano; o
- 45 b) contactar dicho órgano o tejido descelularizado con uno o más compuestos para favorecer o estimular las células durante el proceso de recelularización.

10. El método de la reivindicación 9, en donde dichas células regenerativas son inyectadas o perfundidas en dicho órgano o tejido descelularizado.
- 5 11. El método de la reivindicación 9a), en donde dicho órgano descelularizado es un corazón, un riñón, un hígado, un bazo, un páncreas, una vejiga, músculo esquelético, intestino delgado, intestino grueso, estómago, hueso, cerebro o un pulmón.
12. El método de la reivindicación 9, en donde el número de dichas células regenerativas unidas a dicho órgano o tejido descelularizado es aproximadamente de entre 1000 células/mg de tejido y 10 000 000 de células/mg de tejido.
- 10 13. El método de la reivindicación 9, en donde dichas células regenerativas son células pluripotentes o son células madre embrionicas distintas de células embrionicas humanas o un subconjunto de ellas, células de cordón umbilical o un subconjunto de ellas, células de médula espinal o un subconjunto de ellas, células de sangre periférica o un subconjunto de ellas, células progenitoras o células madre derivadas de un adulto o un subconjunto de ellas, células progenitoras o células madre obtenidas de tejido o un subconjunto de ellas, células madre mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés) o un subconjunto de ellas, células progenitoras o células madre obtenidas de músculo esquelético o un subconjunto de ellas, células progenitoras de adulto multipotentes (MAPC, por sus siglas en inglés) o un subconjunto de ellas, células madre cardiacas (CSC, por sus siglas en inglés) o un subconjunto de ellas, células madre multipotentes obtenidas de un corazón adulto o un subconjunto de ellas, fibroblastos cardiacos, células endoteliales de microvasculatura cardiaca o células endoteliales aórticas.
- 15 14. El método de la reivindicación 9, en donde dichas células regenerativas son alogénicas o xenogénicas de dicho órgano descelularizado; o en donde dichas células regenerativas son alogénicas o xenogénicas de dicha matriz extracelular, o en donde el órgano o tejido está expuesto a una presión o carga mecánica.
- 20 15. El método de la reivindicación 9b), en donde dicho compuesto es un factor de crecimiento o en donde dicho compuesto es un factor que modifica la cascada de coagulación, o en donde dicho compuesto es un agente modulador de la respuesta inmune.

25

30

35

40

1/2

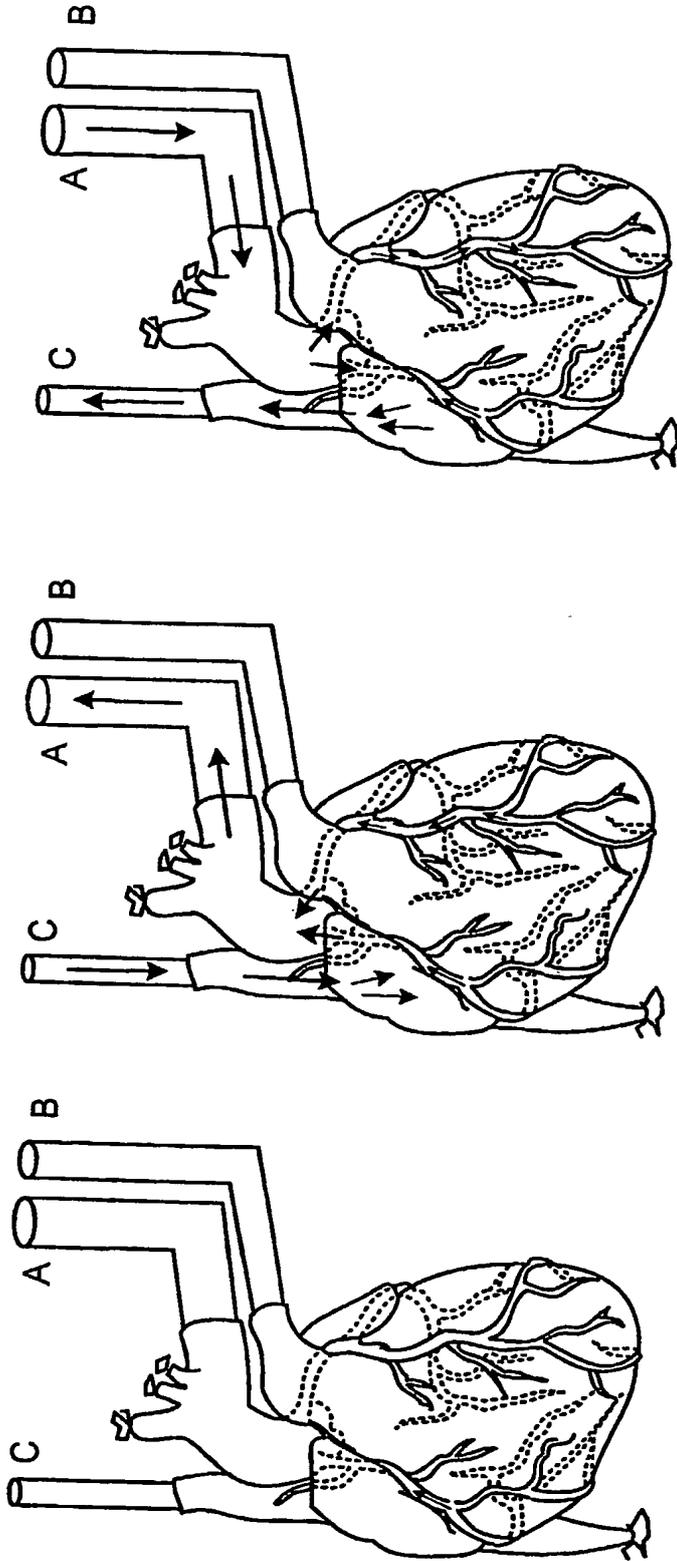


FIG. 1

