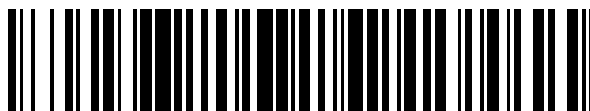


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 577 293**

51 Int. Cl.:

A61L 27/26 (2006.01)

A61L 27/24 (2006.01)

A61L 27/60 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.12.2006** **E 06841875 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016** **EP 1960011**

54 Título: **Utilización de un polisacárido excretado por la especie *Vibrio diabolicus* para ingeniería de tejidos conectivos no mineralizados**

30 Prioridad:

07.12.2005 FR 0512413

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

14.07.2016

73 Titular/es:

**INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE POUR
L'EXPLOITATION DE LA MER (IFREMER) (50.0%)
155, rue Jean-Jacques Rousseau
92130 Issy-les-Moulineaux Cedex, FR y
UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES - PARIS 5
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**SENNI, KARIM;
SINQUIN, CORINNE;
COLLIEC-JOUAULT, SYLVIA;
GODEAU, GASTON-JACQUES y
GUEZENNEC, JEAN**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 577 293 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

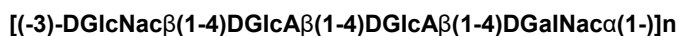
Utilización de un polisacárido excretado por la especie *Vibrio diabolicus* para ingeniería de tejidos conectivos no mineralizados

Sector de la técnica

La presente invención se refiere a la ingeniería de tejidos conectivos no mineralizados, específicamente a los tejidos de revestimiento (piel, encía, cartílago, tendones).

Estado de la técnica

Las bacterias productoras de exopolisacárido (EPS) se aislaron entre microorganismos procedentes de ecosistemas hidrotermales profundos. HE800 es un EPS producido por la cepa *Vibrio diabolicus*. Su masa molar promedio en peso es de aproximadamente 800.000 g/mol en estado nativo. Se caracteriza por una secuencia osídica repetitiva lineal original constituida por 4 residuos osídicos:



HE800 se ha descrito en la solicitud internacional en nombre de IFREMER publicada con el número WO9838327 así como en los siguientes artículos: Raguénès *et al*, *Int J Syst Bact* 1997, 47, 989-995 y Rougeaux *et al*, *Carbohydr. Res*, 1999, 322, 40-45. Se han descrito numerosas aplicaciones para este exopolisacárido. A modo de ejemplo de aplicación, puede citarse la solicitud internacional WO0202051, que describe las propiedades beneficiosas de HE800 en la cicatrización ósea. Hasta el momento no se conoce aplicación alguna de HE800 con respecto a la ingeniería de tejidos conectivos no mineralizados.

El tejido conectivo se caracteriza por la presencia entre sus células de una matriz extracelular muy abundante. La matriz extracelular constituye el almacén del tejido conectivo no mineralizado. Confiere a los tejidos conectivos no mineralizados su forma, resistencia mecánica, flexibilidad y asegura importantes funciones fisiológicas. La organización de la trama de colágeno es un componente esencial de la estructuración tisular. En efecto, los colágenos, y especialmente los colágenos fibrilares constituyen la clase proteica mayoritaria de las matrices extracelulares y en particular las de la dermis de la encía y del cartílago.

La matriz extracelular es igualmente necesaria para mantener el estado diferenciado de las células que la sintetizan y la remodelan, en particular las células mesenquimales (fibroblastos, miofibroblastos, condrocitos, pericitos...) que son las células reinas de los tejidos conectivos no mineralizados. Se distingue principalmente los miofibroblastos que proliferan durante la cicatrización pero persisten en los procesos inflamatorios crónicos que dan lugar al establecimiento de fibrosis.

El principal objetivo de la ingeniería tisular es la reconstrucción tanto de tejidos como de órganos humanos. Se desarrollan numerosas formas.

Una primera forma consiste en implantar una estructura de guía en un tejido dañado. La estructura de guía sirve como molde para el tejido a reconstruir. La estructura puede enriquecerse cuando proceda con moléculas que estimulan el crecimiento celular. Como ejemplo de este enfoque de ingeniería tisular puede citarse el documento EP1555035, que describe un implante bioabsorbible compuesto por una matriz mixta de colágeno-glicosaminoglicano reticulada. Esta matriz constituye una estructura de guía que tiene por objeto señalar el potencial de regeneración del tejido.

Una segunda forma de ingeniería tisular consiste en reconstruir *ex vivo* sustitutos de tejidos a partir de células vivas para usos *in vivo* o *ex vivo*. El objetivo es reproducir la arquitectura tisular. El método basado en la producción de un gel de colágeno fue el primero en demostrar las amplias posibilidades de la ingeniería tisular. Los primeros trabajos de reconstrucción tisular realizados pusieron de manifiesto que la incorporación de fibroblastos en un gel de colágeno permitía producir equivalentes dérmicos que podrían entonces epidermizarse por la siembra de queratinocitos en su superficie. El resultado final, una piel reconstruida viva, puede alcanzar un excelente nivel de diferenciación en las condiciones de cultivo adecuadas y de este modo pueden reproducirse numerosos aspectos de la diferenciación terminal de los queratinocitos. Este método de reconstrucción tisular resultó aplicable en la producción de otros muchos órganos para fines clínicos (trasplante) o teóricos (modelado tisular *in vitro*). No obstante, no está claro que este método permita obtener tejidos con una resistencia mecánica indispensable para su aplicación clínica.

Este aspecto mecánico es uno de los motivos que impulsaron al desarrollo de un segundo método, basado en el uso de biomateriales colonizables con células y su cultivo *in vitro*. De esta forma, las células ya incorporadas a dichos soportes secretan cantidades variables de matriz extracelular que dan lugar a la reconstrucción de una estructura tisular similar al tejido original, aunque comprende igualmente la trama biodegradable del biomaterial. A modo de ejemplo del método de ingeniería tisular puede mencionarse el documento WO03041568 que describe una matriz

tridimensional que comprende una matriz de fibrina y fibroblastos. Esta matriz permite generar equivalentes de tejidos que pueden injertarse. Uno de los objetivos de la presente invención es una matriz con propiedades mecánicas mejoradas que favorece la proliferación de fibroblastos.

- 5 Los inventores han puesto de manifiesto, de manera sorprendente e inesperada, que un polisacárido de masa molar promedio en peso comprende entre 500.000 y 2.000.000 g/mol, caracterizada por una secuencia osídica repetitiva lineal que comprende los 4 residuos osídicos siguientes:

10 **[(-3)-DGlcNAc β (1-4)DGlcA β (1-4)DGlcA β (1-4)DGalNac α (1)]** presenta las siguientes propiedades: induce una selección de cepas fibroblásticas, estimula la movilización y proliferación de fibroblastos en la matriz extracelular, acelera la fibrilación de colágeno y favorece así la reconstitución de la matriz extracelular.

Este polisacárido permite la reestructuración de la trama de colágeno de los tejidos conectivos no mineralizados, y constituye un soporte que permite la adhesión y la proliferación celular de fibroblastos.

15 De esta manera, por sus propiedades, el polisacárido permite la fabricación de la matriz de colágeno fibrilar con propiedades mejoradas. La trama de colágeno de las matrices de colágenos fibrilares que comprenden el polisacárido presenta una mejor resistencia ante factores físicos, tales como la temperatura y las tensiones mecánicas. Por último, favorece el cultivo de células mesenquimales, en particular el cultivo de fibroblastos y permite la fabricación del sustituto de tejidos.

Objeto de la invención

25 La invención tiene por objeto la utilización de un polisacárido o una sal de este polisacárido de masa molar promedio en peso comprendida entre 500.000 y 2.000.000 g/mol, preferentemente comprendida entre 700.000 y 900.000 g/mol, caracterizada por una secuencia osídica repetitiva lineal que comprende los siguientes 4 residuos osídicos:

30 **[(-3)-DGlcNAc β (1-4)DGlcA β (1-4)DGlcA β (1-4)DGalNac α (1)]** para ingeniería de tejidos conectivos no mineralizados.

La presente invención tiene por objeto una matriz de colágeno que comprende un polisacárido o una sal de dicho polisacárido de masa molar promedio en peso comprendida entre 500.000 y 2.000.000 g/mol, preferentemente comprendida entre 700.000 y 900.000 g/mol, caracterizada por una secuencia osídica repetitiva lineal que comprende los siguientes 4 residuos osídicos:

35 **[(-3)-DGlcNAc β (1-4)DGlcA β (1-4)DGlcA β (1-4)DGalNac α (1)]**

Generalmente, el polisacárido puede encontrarse en forma de sal.

40 Generalmente, el polisacárido es un polisacárido excretado por la especie *Vibrio diabolicus* de tamaño comprendido entre 500.000 y 2.000.000 daltons. Los modos de preparación se han descrito en los siguientes documentos: WO 98/38327, Raguénès *et al*, *Int J Syst Bact* 1997, 47, 989-995 y Rougeaux *et al*, *Carbohydr. Res* 1999, 322, 40-45.

45 Normalmente, el colágeno de la matriz es un colágeno seleccionado entre el grupo que consiste en colágenos fibrilares, tales como los colágenos tipo I, II, III, V y XI o una mezcla de los mismos. Preferentemente, el colágeno es un colágeno de tipo I.

En general, para fabricar dicha matriz de colágeno, el experto en la materia utilizará las técnicas empleadas habitualmente para la fabricación de matrices de colágeno a partir de colágenos fibrilares ácido-solubles. En presencia del polisacárido según la invención, los colágenos fibrilares ácido-solubles se fibrilan de manera natural tras la neutralización del pH. Alternativamente, la matriz de colágeno según la invención puede obtenerse por enlace cruzado del polisacárido según la invención con el colágeno. Para realizar el enlace cruzado, el experto en la materia empleará las técnicas utilizadas de modo habitual para enlace cruzado de polisacáridos con el colágeno. El documento EP1374857 es una ilustración de una técnica de enlace cruzado utilizable.

55 La presente invención tiene por objeto asimismo una matriz que comprende el polisacárido descrito previamente, caracterizado por que el polisacárido se ha vuelto insoluble por reticulación utilizando uno o más agentes reticulantes.

60 Generalmente, para reticular con el fin de insolubilizar el polisacárido según la invención, el experto en la materia utilizará las técnicas empleadas habitualmente para la reticulación de polisacáridos. Como ejemplos de agentes reticulantes, puede citarse trimetafosfato de sodio, epiclorhidrina, divinilsulfona, glutaraldehído y bisepoxiranos, como por ejemplo éter de 1,4-butanodiol-bis (epoxipropil) y éter de 1,4-butanodiol-diglicidil.

65 Ventajosamente, las matrices según la invención podrán comprender, además, un factor de crecimiento que favorece la colonización de la matriz por las células mesenquimales, en particular por los fibroblastos.

Preferentemente, el factor de crecimiento puede seleccionarse entre el grupo que consiste en FCT-beta, FCDP, FCFs, PMOs (proteínas morfogenéticas óseas), FCEV, FCTC (factor de crecimiento de tejido conectivo).

5 Normalmente, las matrices según la invención pueden servir como dispositivo médico, reabsorbible o no, o como implante o pueden incorporarse en un dispositivo médico o implante. Dichas matrices permiten la sustitución mecánica y funcional de las estructuras dañadas con un mínimo de reacciones adversas. Estas matrices, una vez depositadas en el tejido o implantadas en un tejido dañado, sirven como estructura de guía y señalan el potencial regenerativo del tejido. La presencia del polisacárido en la matriz acelera la regeneración estimulando la reestructuración de los tejidos conectivos. Permite conseguir una regeneración completa de manera que se evita la aparición de situaciones patológicas tipo fibrótico o inflamatorio. La presencia del polisacárido en la matriz también favorece la penetración de manera ordenada tras el injerto de la matriz de células mesenquimales de tejidos conectivos no mineralizados, tales como fibroblastos, fomentando a estas mismas células a producir su propia matriz extracelular.

15 Por ejemplo, el dispositivo médico puede ser un apósito.

Según un modo de realización preferente de la invención, las matrices según la invención pueden comprender además células mesenquimales de cualquier tejido conectivo no mineralizado a fin de formar un sustituto de tejido conectivo, en particular un sustituto dérmico, del cartílago o del tendón. Este sustituto puede implantarse *in vivo*. La matriz puede incluir células mesenquimales de la médula o de la sangre circulante, fibroblastos o condrocitos.

Ventajosamente, las células mesenquimales que colonizan la matriz, son fibroblastos dérmicos de modo que constituyen un sustituto dérmico. La matriz también puede comprender queratinocitos para formar un sustituto de la piel.

Ventajosamente, las células mesenquimales, que colonizan la matriz, son condrocitos a fin de constituir un sustituto del cartílago.

30 Según otro modo de realización, la invención se refiere a un soporte de cultivo celular caracterizado por que la superficie de soporte sobre la que se cultivan las células comprende el polisacárido según la invención.

Generalmente, el polisacárido se encuentra en forma de película, membrana o una estructura alveolada tridimensional o hidrogel.

35 Según otro modo de realización, la invención se refiere a un método de cultivo de células mesenquimales, en particular fibroblastos, específicamente fibroblastos dérmicos, caracterizado por que dichos fibroblastos se cultivan en una matriz según la invención o en un soporte como el descrito previamente.

40 A continuación, la presente invención se ilustrará mejor con los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan únicamente a título ilustrativo del objeto de la invención, que no constituyen en modo alguno una limitación.

Descripción detallada de la invención

45 Ejemplos

1 Materiales y métodos

1.1. Preparación del exopolisacárido HE800 a partir de cultivos de *Vibrio Diabolicus* (cepa HE800).

50 Se han descrito modos de preparación de HE800 en los siguientes documentos: WO 98/38327, Raguénès *et al*, *Int J Syst Bact*, 1997, 47, 989-995 y Rougeaux *et al*, *Carbohydr. Res*, 1999, 322, 40-45.

a) Cultivos de *Vibrio diabolicus*

55 La cepa HE800 se cultiva en un medio 2216E [OPPENHEIMER, *J. Mar. Res.* 11, 10-18 (1952)] enriquecido con glucosa (30 g/l). La producción se lleva a cabo a 30 °C y con un pH 7,4 en un fermentador de 2 litros que contiene 1 litro del medio 2216E glucosado. Tras 48 horas de cultivo, el mosto presenta una baja viscosidad (aproximadamente 40 centipoises a 60 rpm).

60 b) Purificación del exopolisacárido

Las bacterias se separan del mosto por una centrifugación a 20.000 g durante 2 horas, a continuación el polisacárido se precipita a partir del sobrenadante empleando etanol puro, luego se realizan varios lavados con etanol/agua en proporciones crecientes de etanol, según el método descrito por TALMONT *et al*. [*Food Hydrocolloids* 5, 171-172 (1991)] o VINCENT *et al*. [*Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 4134-4141 (1994)]. El polisacárido resultante se seca a 30 °C

y se conserva a temperatura ambiente. De este modo, se obtuvieron 2,5 g de polisacárido purificado por litro de cultivo.

1.2 Obtención de fibroblastos

Los experimentos se realizaron en fibroblastos de origen dérmico y fibroblastos de origen gingival. Estos dos tipos de células mesenquimales adoptan con respecto a HE800 un comportamiento muy similar, por consecuencia los resultados obtenidos con los fibroblastos gingivales se extrapolan a los fibroblastos dérmicos.

1.2.1) Medios de cultivo:

Los cultivos se realizan en un medio, completo, compuesto de Dulbecco MEM Glutamax I que contiene 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y 2 µg/ml de fungizona (Gibco BRL Cergy Pontoise, Francia) suplementado o no (medio deficiente) con suero de ternera fetal (STF).

1.2.2) Origen de las muestras tisulares:

Las biopsias dérmicas utilizadas se cultivan en las 3 horas siguientes tras tomar el experto la muestra. Las muestras utilizadas se obtienen tras la circuncisión de prepucios de niños clínicamente sanos. Las biopsias gingivales se obtienen de pacientes jóvenes (menores de 30 años) exentos de patologías. Estas biopsias se realizan en la encía adherida a los premolares extraídos por razones de ortodoncia. El experto declara clínicamente sanas estas encías. Estas biopsias son fragmentos tisulares retirados durante la extracción y no requieren modificación alguna en la intervención quirúrgica.

1.2.3) Cultivo:

Las muestras dérmicas y gingivales se enjuagan dos veces en un medio DMEM que contiene una concentración de antibióticos superior a la normal (penicilina 6x, estreptomycin 4x, fungizona 2x) a continuación, se cortan en explantes muy pequeños ($\approx 2\text{mm}^2$). Estos explantes se depositan en la pipeta de Pasteur estéril o con la punta del escalpelo en un frasco de cultivo de 25 cm², medio parénquima en el plástico. La placa se eleva y se deja 15 minutos en esta posición para que los explantes, en seco, se adhieran al plástico.

Los explantes adheridos se cubren con unas gotas de DMEM suplementado con suero de ternera fetal al 20 % (STF). La placa de cultivo se coloca durante la noche en una incubadora a 37 °C en una atmósfera compuesta por CO₂ al 5 % y aire al 95 %. Al día siguiente, el sobrenadante se reemplaza con medio fresco que contiene STF al 20 %, posteriormente se renueva cada semana. Tras tres semanas, los fibroblastos han colonizado todo el fondo de la placa (los queratinocitos presentes en el explante no se adhieren en estas condiciones de cultivo), se procede entonces al trasplante. Los explantes se eliminan mediante unas pinzas, las células se enjuagan dos veces con TFS y se tratan con tripsina (Tripsina EDTA Gibco). La tripsinización se detuvo por adición de DMEM que contiene STF al 10 %. Las células se cuentan en el contador (Coulter) y se vuelven a sembrar en varias placas de cultivo. En ese momento, estas se consideran primer pase y se mantienen en un medio completo que contiene STF al 10 %. Cuando las células son confluentes de nuevo se realiza otro pase siguiendo el mismo procedimiento, y hasta el inicio de los experimentos.

1.3. Preparación de películas y cultivo de fibroblastos

1.3.1) Preparación de películas de HE800 y cultivo de fibroblastos

Se realizó una humectación para el depósito de 200 µl de una solución a 2 mg/ml de HE800 en el fondo de los pocillos de cultivo (placa de 24 pocillos, 2 cm²). La placa de cultivo se deposita bajo una campana de cultivo en una platina caliente ajustada a 37 °C, durante al menos 5 horas. Tras la evaporación, se forma una película de HE800 en el fondo de la placa. Los fibroblastos gingivales se siembran a razón de 10.000 células por pocillo y se cultivan durante 7 días. Cada día se lleva a cabo un recuento de células, algunos pocillos se establecen para el estudio morfológico e inmunodetección de actina α de músculo liso.

1.3.2) Preparación de películas de colágeno y películas composite colágeno-HE800 y cultivo de fibroblastos:

El colágeno empleado es colágeno de tipo I ácido-soluble (2 mg/ml) obtenido a partir de la cola de rata (Institut Jacques Boy, Reims). La humectación de las placas de cultivo se lleva a cabo por el depósito de 200 µl de una mezcla de colágeno (40 µg total) y HE800 (5, 50, o 200 µg total).

La placa de cultivo (placa de 24 pocillos, o labtek, 2 cm² por pocillo) se deposita bajo una campana de cultivo en una platina caliente ajustada a 37 °C durante al menos 5 horas. Tras la evaporación, se forma una película de colágeno con o sin HE800 en el fondo la placa. Los fibroblastos se siembran en estas películas para asegurar la biocompatibilidad de la nueva superficie de cultivo.

1.3.3) Caracterización de la estructura de las películas:

Las películas de colágeno y las películas composites se fijan con etanol absoluto a -20 °C, luego se rehidratan para teñirse en rojo sirio (tinción de Junquera, específica para colágenos). De este modo, en rojo Sirio, bajo luz transmitida, todos colágenos se tiñen, pero sólo los colágenos correctamente fibrilados son capaces de desviar la luz polarizada.

1.4. Cultivo en entramados (matriz de colágeno): preparación del tejido conectivo no mineralizado equivalente.

Las entramados se forman con el mismo colágeno I que el utilizado para formar las películas de colágeno. Tras la neutralización de la solución ácida de colágeno (3 mg/entramados), el gel que contiene las células y que está en proceso de polimerización se vierte en una placa de Petri de 5 cm de diámetro. HE800 se añade al colágeno antes de la adición de las células a razón de 150 µg, 300 µg o 600 µg por entramado (5 %, 10 % y 20 %; respectivamente de la cantidad total de colágeno).

1.4.1) Preparación de la solución madre:

Compuestos	Cantidad
DMEM (polvo)	5 g
NaHCO ₃	1,1 g
AA no esenciales (100X)	5 ml
H ₂ O biΔ (estéril)	17 ml
Filtro	
H ₂ O biΔ (estéril)	250 ml

Para 50 ml de solución madre añadir 10 ml de suero de ternera fetal

1.4.2) Preparación de los entramados:

Todas las etapas de preparación de los entramados se realizan en el vidrio

solución madre (STF)	2,75 ml
colágeno (2 mg/ml)	1,5 ml
NaOH (0,1 N)	0,25 ml
células (300.000/ml)	0,5 ml

- Mezclar, a continuación verter en la placa de Petri y reposar el entramado durante 5 minutos a 37 °C.
- Tras 1 h las placas se mezclaron ligeramente para separar los entramados de los bordes.
- Los medios de cultivo se cambian semanalmente.

1.4.3) Caracterización de los entramados (matrices de colágeno):

En diferentes tiempos de cultivo (11 y 40 días) los entramados se recuperan fijados en paraformaldehído y se preparan para el embebido en parafina. Las secciones de 7µm de grosor se realizan en un microtomo. Las tinciones específicas de estas secciones permiten observar y estudiar la estructura, la celularidad de los tejidos conectivos reconstruidos. Algunos de los parámetros identificados a continuación pueden estudiarse mediante análisis de imágenes y de este modo pueden cuantificarse. Se observa la calidad de la fibrilación de colágeno tras la tinción con rojo sirio, la celularidad de los tejidos conectivos equivalentes puede estimarse por el análisis de imágenes de las secciones con hemalum-eosina.

1.4.4) Determinación del número de fibroblastos contenidos en los entramados:

La tinción por hemalum-eosina permite distinguir las células de la matriz que las rodea. Efectivamente, el hemalum tiñe los núcleos de las células en azul negruzco, mientras que la eosina tiñe en rojo más o menos intenso los citoplasmas y las estructuras extracelulares (eosinófilos). Así, el contraste creado permite distinguir cada célula en un microscopio equipado con una cámara DCA conectada a un analizador de imágenes semiautomático. Las células que se encuentran en los campos definidos por el aumento microscópico se cuentan en los entramados a los 11 y 40 días. Se analizaron una decena de zonas por sección. Por lo tanto, dos grupos de células pueden diferenciarse

según su ubicación: las células situadas en el entramado (matriz de colágeno) por una parte, y las células situadas en la periferia del entramado por otra parte. Para calcular la celularidad de los tejidos conectivos equivalentes cada entramado se considera cilíndrico, la periferia del entramado se define como un anillo de 10 µm de grosor (equivalente al diámetro de dos capas celulares) que representa el 2 % del volumen total del entramado.

1.5. Inmunodetección indirecta de la actina α de músculo liso.

Las células fijadas se vuelven a permeabilizar en etanol al 70 % (20 min), luego se rehidratan en TFS (10 min). Las peroxidasas endógenas se bloquean con una solución de metanol (30 %), H₂O₂ (0,3 %). Esta operación es seguida por un enjuague con TFS (2 min) seguido de un bloqueo de los sitios antigénicos no específicos por una solución TFS/leche desnatada al 1 % (1 h). Los cultivos se incuban con un anticuerpo primario (IgG de ratón) dirigido contra α -actina humana (1/30; 50 min), a continuación se enjuagan con TFS (3 x 10 min). Las células se incuban en la oscuridad durante 60 min con un anticuerpo anti-IgG de ratón biotinilado (1/200), se enjuagan con TFS (3 x 10 min) y después se incuban con estreptavidina acoplada a la peroxidasa (1/200).

Tras el enjuague (TFS 3 x 10 min), la revelación de la actividad peroxidasa con 3-3' diaminobencidina se lleva a cabo en un tampón Tris/HCl (100 mM, pH 7,2-7,4) que contiene 0,1 % de H₂O₂ (15 min en la oscuridad). La actividad de la peroxidasa se revela en un material fibrilar marrón (correspondiente a los microfilamentos de α -actina) en el citoplasma de las células positivas.

Los productos utilizados proceden de la compañía DAKO. Los experimentos controlados con respecto a la inmunodetección de actina α de músculo liso se realizaron omitiendo el anticuerpo primario y/o mediante un anticuerpo secundario de otra especie animal que permite obtener el anticuerpo primario.

2. Resultados y Discusión

2.1. Proliferación de fibroblastos gingivales cultivados en la película de HE800

Las superficies de cultivo se han tratado por HE800, para formar una película polisacárida en el fondo de las placas. Se observa, durante los primeros días de cultivo (días 2 y 4) que el número de células sembradas en las placas revestidas por el HE800 es muy inferior al número de las de las placas de control (Tabla I). En el último día del experimento, se observa en cambio, una inversión de estos resultados (Tablas I y II). Las curvas presentadas muestran que las células cultivadas en la película de HE800 indican un tiempo de latencia antes de la entrada en fase de crecimiento exponencial, más prolongado que el expresado por las células cultivadas en plástico. Por otra parte, mientras que el número de células de los cultivos de control alcanzó una meseta los días posteriores del experimento (véase, la Tabla III), los cultivos en la película HE800 continúan proliferando. Las observaciones realizadas durante el cultivo o tras la fijación de las células permiten establecer hipótesis en cuanto a los comportamientos celulares expresados en las diferentes condiciones de cultivo.

Los cultivos en la película de HE800 se caracterizan en los primeros días de cultivos por la presencia de numerosas células que no se adhieren al soporte. Esta ausencia de adhesión puede explicar el retraso en la proliferación observada durante los recuentos celulares en estos cultivos.

Las células de control se distribuyen de manera uniforme en la placa, sin orientación particular, mientras que las células sembradas en la película HE800 se organizan en bandas en el centro de la placa. Estos resultados muestran la incidencia de HE800 en la adhesión celular. En efecto, las agrupaciones celulares que se observan normalmente en los cultivos gingivales, no tienen una orientación específica. Tras los primeros 2 días de cultivo estas bandas celulares comienzan a formar una estructura central circular, densificándose únicamente hacia el centro (proliferación centripeta). Se puede apreciar asimismo numerosas células en la periferia de la placa aunque sin orientación particular. Algunas células pueden estar presentes en las zonas que separan las agrupaciones celulares, estas se aíslan y parecen mucho más alargadas que las otras células de las placas HE800 o incluso el control. El marcaje inmunocitoquímico referente a la actina α de músculo liso muestra:

- En los controles, numerosas células positivas mezcladas con células que no expresan estos microfilamentos.
- En los cultivos en presencia de HE800, las células presentes en las formaciones circulares centrales no expresan actina α de músculo liso, en cambio las células que expresan esta isoforma de actina pueden hallarse en la periferia de la placa.

Estos resultados reflejan una selección de cepas fibroblásticas, de hecho, algunas células pueden no expresar de forma natural los receptores de membrana necesarios para su adhesión en la película de HE800. Entre las subpoblaciones fibroblásticas no adherentes se hallan las que expresan actina α de músculo liso, es decir, miofibroblastos. En los experimentos de control (omisión del anticuerpo primario o utilización de un anticuerpo secundario inapropiado) no se observó positividad alguna.

Tabla I: Variación del número de células por pocillos durante el cultivo

	Día 2	Día 4	Día 7
Control	14.812	45.610	52.980
HE800	10.035	36.995	64.247

Tabla II: Porcentajes de proliferación Tabla III: Tiempo de duplicación (horas)

	Día 2	Día 4	Día 7			Td 0-2	Td 2-4	Td 4-7
Control	100	100	100		Control	84,68	29,58	333,2
HE800	67,75	81,11	127,27		HE800	9.522,64	25,50	90

5 2.2. Estructuración de colágeno de tipo I en presencia de HE800

2.2.1) Primeras comprobaciones

A fin de realizar las películas que comprenden a la vez colágeno y el exopolisacárido HE800, las soluciones de HE800 y colágeno I se mezclan previamente antes de la deposición en las placas de cultivo. Sorprendentemente, se observó que la adición del exopolisacárido bacteriano en la solución de colágeno provoca la aparición de un denso aglomerado blanco. Este aglomerado se ha podido extender en un portaobjetos histológico y teñirse con rojo sirio, el colorante específico para colágenos. Estos portaobjetos histológicos muestran que efectivamente el material extendido en el portaobjetos se tiñó con rojo sirio. Además, la observación de un material que desvía en diferentes direcciones la luz polarizada muestra claramente la presencia de colágeno en su forma fibrilar.

2.2.2) Organización de las películas composites colágeno/HE800:

Las diversas películas depositadas se componen de:

- (1) colágeno (40 µg)
- (2) colágeno (40 µg) + HE800 (50 µg)
- (3) colágeno (40 µg) + HE800 (200 µg)

La observación en el microscopio del fondo de las placas muestra para las películas (3) la aparición de una densa red compuesta por filamentos largos. Las películas (2) contienen algunas fibras mucho más cortas, mientras que las películas (1) no contienen prácticamente. Las 3 películas se tiñen con rojo sirio, pero sólo la película (3) muestra una red fibrilar que desvía la luz polarizada.

Estos resultados indican que HE800 favorece la formación de fibras de colágeno, aunque también permite una mejor resistencia de la trama de colágeno ante factores físicos, tales como la temperatura y las tensiones mecánicas.

2.3. Tejido conectivo no mineralizado: Microscopía fotónica y electrónica

Las células se cultivan en una matriz de colágeno (modelo de cultivo tridimensional) con el fin de imitar mejor las interacciones células/matriz observadas en el tejido conectivo. Estos entramados o tejidos conectivos equivalentes se componen de sólo colágeno I (control) o de colágeno I y HE800 en diversas proporciones (cantidad de EPS = 20, 10 y 5 % en relación a la cantidad de colágeno contenido en el entramado, es decir, 300, 150, y 75 µg; respectivamente).

2.3.1) Retracción de los entramados:

El primer parámetro estudiado es la velocidad de retracción de los entramados: las curvas de retracción de los entramados de control y de los entramados que contienen HE800 son similares. A pesar de estas similitudes, se aprecia que los entramados HE800 tienen una velocidad de retracción más lenta que los entramados de control durante los primeros días de cultivo. Tras el 11º día la retracción de los entramados es casi total.

2.3.2) Número de fibroblastos contenidos en los entramados:

El número de células presentes en cada entramado varía en ambos tiempos de cultivo entre 180.000 y 250.000 células. El número de células en la periferia representa 2 a 12 % del número total de células. Estos datos son acordes con lo que se ha descrito en la literatura para este modelo de cultivo. Los resultados de las tablas IV, V y VI muestran el número de células por unidad volumétrica (mm³) presentes en todo el entramado y sus diferentes regiones. Las densidades celulares volumétricas totales de los entramados tras 11 y 40 días se comprenden entre 3.200 y 5.900 células/mm³ (véase la tabla IV). Estos valores son comparables a los hallados en un tejido conectivo humano normal como se ha descrito previamente (Miller *et al.*, *Exp Dermatol.* agosto de 2003; 12(4):403-11). La celularidad fisiológica de los entramados de control y los entramados que comprenden HE800 da fe por tanto de la

validez del modelo de cultivo utilizado y la compatibilidad HE800 con este modelo fisiológico.

La densidad celular total (véase la tabla IV) de los entramados de control no varía independientemente del tiempo de cultivo. En el 11º día de cultivo, la densidad celular total de los entramados HE800 es inferior un 25 a 40 % a la de los entramados de control. En el 40º día de cultivo las densidades celulares de los entramados de control y de los entramados HE800 son equivalentes. Los cambios en las densidades celulares observados en los entramados (véase la tabla V) reproducen exactamente las de todo el entramado. La organización topológica de las células del anillo periférico (tabla VI) diverge en cambio por completo de la de las tablas IV y V.

- En 11 días de cultivo, las densidades celulares del anillo periférico son 4 veces superiores a las del interior del entramado y muestran poca variación entre los tejidos conectivos equivalentes de control y los tejidos conectivos equivalentes que comprenden HE800 (tabla VI).
- En 40 días de cultivo, se observa una fuerte disminución de la celularidad periférica. Si esta reducción es sólo del 40 % para los entramados de control, esta alcanza 100 a 250 % para los entramados que contienen HE800. La densidad celular de los entramados de control sigue siendo 3 veces superior en la periferia que en el interior (tabla IV y VI), en cambio estas densidades son comparables para los entramados HE800.

La celularidad general de los entramados HE800 es más baja que la de los entramados de control en los primeros días de cultivo, luego se vuelven equivalentes en los días posteriores de cultivo. Estas variaciones que afectan a las densidades celulares de las regiones internas pueden explicarse por una estimulación de la proliferación celular, o una migración masiva de las células periféricas al interior.

En efecto, en la periferia de los entramados, el número de células disminuye durante el tiempo de cultivo, esta disminución es particularmente pronunciada en los entramados que comprenden HE800 (disminución de 2 a 3,5 veces del número de células). Esta disminución puede explicarse por una pérdida de adhesión de las células periférica que se separan de la matriz extracelular y/o una migración masiva de estas células al interior. Esto explica las ganancias generales de celularidad, con el tiempo, en los entramados que contienen HE800.

Tabla IV: Densidad celular en la totalidad del entramado: número de células por mm³ (entre paréntesis: diámetro de entramados en mm).

Tiempo de cultivo	11 días	40 días	Variación entre 11 y 40 días
Control	5.924 (8,3)	5.695 (8)	-4 %
HE800 al 20 %	4.468 (8)	6.150 (8)	+27 %
HE800 al 10 %	3.899 (9,7)	6.000 (8)	+35 %
HE800 al 5 %	3.491 (1,03)	5.023 (8)	+30 %

Tabla V: Densidad celular en el interior de los entramados: número de células por mm³.

Tiempo de cultivo	11 días	40 días	Variación entre 11 y 40 días
Control	5.568	5.520	-3 %
HE800 al 20 %	4.153	6.085	+22 %
HE800 al 10 %	3.517	5.938	+41 %
HE800 al 5 %	3.220	5.005	+36 %

Tabla VI: Densidad celular en la periferia del entramado: número de células por mm³

Tiempo de cultivo	11 días	40 días	Variación entre 11 y 40 días
Control	20.134	14.382	-40 %
HE800 al 20 %	23.367	6.531	-258 %
HE800 al 10 %	22.161	9.979	-122 %
HE800 al 5 %	17.731	5.939	-199 %

Conclusión: HE800 favorece la proliferación de fibroblastos dérmicos en la matriz extracelular y/o favorece su movilización es decir, la selección, la migración y la penetración masiva de células periféricas.

2.4.3) Estado de la matriz de colágeno:

2.4.3.1) Microscopía fotónica

La tinción con rojo sirio (tinción de Junquera) permite teñir de manera específica los colágenos, en la piel por ejemplo sus colágenos que aparecen como una estructura filamentosa suelta, teñida en rojo.

5 Las tinciones con rojo sirio de las secciones histológicas tras la observación con luz transmitida y luz polarizada muestran que la adición de HE800 durante la formación del entramado permite la formación de una matriz mucho más densa y en plazos mucho más breves que en los entramados de control.

10 Por ejemplo: la densidad de la matriz de colágeno del control tras 40 días de cultivo es equivalente a la observada en las matrices de colágeno formadas en presencia de HE800 en 11 días de cultivo. Este efecto sobre la densidad es mucho mayor en las dosis más bajas (10 %, 5 %).

2.4.3.2) Microscopía electrónica

15 La microscopía electrónica se realizó en tejidos conectivos equivalentes cultivados durante 11 días. Se observó un buen estado ultraestructural de las células, ya sea en el control o en los entramados formados en presencia de diferentes concentraciones de HE800.

20 No se ha podido observar fibra alguna de colágeno en los entramados de control, los entramados que comprenden el 20 % de HE800 permiten observar algunos elementos fibrilares recogidos en un gel que consiste en exopolisacáridos. Los entramados que comprenden el 10 % y el 5 % de los exopolisacáridos son muy diferentes, en efecto numerosas fibras de colágeno están presentes, se distribuyen por todo el entramado y presentan, en algunas, una estriación periódica. Estas fibras o fibrillas de colágeno se capturan en el gel formado por HE800.

25 **Conclusión: HE800 acelera la fibrilación de colágeno y favorece la formación de una matriz extracelular.**

REIVINDICACIONES

1. Matriz de colágeno que comprende un polisacárido o una sal de dicho polisacárido de masa molar promedio en peso comprendida entre 500.000 y 2.000.000 g/mol, preferentemente comprendida entre 700.000 y 900.000 g/mol,
5 **caracterizada por** una secuencia osídica repetitiva lineal que incluye los siguientes 4 residuos osídicos:

[(α -3)-DGlcNac β (1-4)DGlcA β (1-4)DGlcA β (1-4)DGalNac α (1-)]
- 10 2. Matriz según la reivindicación 1, **caracterizada por que** dicho polisacárido es un polisacárido excretado por la especie *Vibrio diabolicus*.
3. Matriz de colágeno según la reivindicación 1, **caracterizada por que** el colágeno es un colágeno seleccionado entre el grupo de colágenos fibrilares que consisten en colágeno de tipo I, II, III, V y XI o una mezcla de los mismos.
- 15 4. Matriz según la reivindicación 3, **caracterizada por que** el colágeno es colágeno de tipo I.
5. Matriz que comprende el polisacárido definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada por que** el polisacárido se ha vuelto insoluble por reticulación utilizando uno o más agentes reticulantes.
- 20 6. Matriz según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además uno o más factores de crecimiento que favorecen la colonización de la matriz por las células mesenquimales, en particular por fibroblastos.
7. Matriz según la reivindicación 6, **caracterizada por que** el o los factores de crecimiento se selecciona(n) entre el grupo que consiste en FCT-beta, FCDP, FCF, FCEV, PMOs, FCTC.
25
8. Matriz según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además células mesenquimales.
9. Matriz según la reivindicación 8, **caracterizada por que** las células mesenquimales son células de la médula ósea o de sangre circulante, fibroblastos o células del cartílago.
30
10. Matriz según la reivindicación 9, **caracterizada por que** las células mesenquimales son fibroblastos dérmicos.
11. Matriz según la reivindicación 10, que comprende además queratinocitos.
- 35 12. Matriz según la reivindicación 8 o 9, **caracterizada por que** las células mesenquimales son condrocitos.
13. Sustituto del tejido conectivo no mineralizado que comprende la matriz según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12.
- 40 14. Sustituto según la reivindicación 13, **caracterizado por que** el sustituto es un sustituto de tendón.
15. Sustituto dérmico que comprende la matriz según la reivindicación 10.
16. Sustituto cutáneo que comprende la matriz según la reivindicación 11.
45
17. Sustituido del cartílago que comprende la matriz según la reivindicación 12.
18. Dispositivo médico o implante que comprende la matriz según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 50 19. Dispositivo médico según la reivindicación 18, **caracterizado por que** el dispositivo médico es un apósito.
20. Método de cultivo *in vitro* de células mesenquimales, en particular fibroblastos, **caracterizado por que** las células mesenquimales se cultivan en la matriz según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 55 21. Utilización *in vitro* de una matriz según una de las reivindicaciones 1 a 12, para la producción de un sustituto de tejido conectivo no mineralizado o un implante útil en ingeniería tisular.