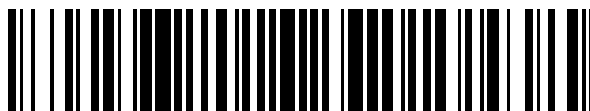


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 589 309**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 5/07</b>	(2010.01)
<b>A61L 27/36</b>	(2006.01)
<b>A61L 27/38</b>	(2006.01)
<b>C12M 3/00</b>	(2006.01)
<b>C12N 5/00</b>	(2006.01)
<b>C12N 5/071</b>	(2010.01)
<b>C12M 1/12</b>	(2006.01)
<b>C12M 1/00</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2003 PCT/US2003/08750**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **09.10.2003 WO03082145**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2003 E 03718019 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.06.2016 EP 1490471**

54 Título: **Fabricación de tejido vascularizado usando moldes bidimensionales microfabricados**

30 Prioridad:

**25.03.2002 US 367675 P**  
**28.06.2002 US 187247**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.11.2016**

73 Titular/es:

**THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION**  
**(100.0%)**  
**55 FRUIT STREET**  
**BOSTON, MA 02114, US**

72 Inventor/es:

**VACANTI, JOSEPH, P.;**  
**SHIN, YOUNG-MOON, MICHAEL;**  
**OGILVIE, JENNIFER;**  
**SEVY, ALEXANDER;**  
**MAEMURA, TOMOYUKI;**  
**ISHI, OSAMU;**  
**KAAZEMPUR-MOFRAD, MOHAMMAD REZA;**  
**BORENSTEIN, JEFFREY T.;**  
**KING, KEVIN R.;**  
**WANG, CHIAO-CHUN y**  
**WEINBERG, ELI, THE CHARLES STARK DRAPER**  
**LAB. INC.**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 589 309 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

Fabricación de tejido vascularizado usando moldes bidimensionales microfabricados

## 5 Solicitudes relacionadas

La presente solicitud es una CIP de U.S.S.N. 09/560.480, presentada el 28 de abril de 2000, que reivindica prioridad a U.S.S.N. 60/131.930 presentada el 30 de abril de 1999, y U.S.S.N. 60/165.329, presentada el 12 de noviembre de 1999. La presente solicitud también reivindica prioridad a U.S.S.N. 60/367.675, presentada el 25 de marzo de 2002, y a U.S.S.N. 10/038.891, presentada el 2 de enero de 2002, que reivindica prioridad a U.S.S.N. 60/259.283, presentada el 2 de enero de 2001.

## Campo de la invención

15 La presente invención se refiere generalmente a los campos del trasplante de órganos y la cirugía reconstructiva, y al nuevo campo de la ingeniería de tejidos. Más específicamente, es un método nuevo y materiales para generar tejidos que requieren un suministro de vasos sanguíneos y otros componentes complejos tales como un suministro nervioso, sistema de drenaje y/o sistema linfático.

## 20 Declaración de posible interés gubernamental

El gobierno de los Estados Unidos puede tener ciertos derechos en la presente invención en virtud del número de subvención 5 R01 HL60424-04 de los NIH y el Acuerdo Cooperativo DAMD-99-2-9001 del Departamento del Ejército.

## 25 Antecedentes

El fallo de órganos vitales es uno de los problemas más críticos a los que se enfrenta el campo sanitario hoy en día. El trasplante de órganos, como actualmente se practica, se ha convertido en una importante terapia de salvamento para pacientes aquejados de enfermedades que destruyen los órganos vitales que incluyen el corazón, hígado, pulmones, riñón e intestino. Sin embargo, la escasez de órganos necesarios para el trasplante se ha convertido en crítica y continúa empeorando. Por ejemplo, en los Estados Unidos, el número de pacientes que esperan un órgano para trasplante ha aumentado por encima de los 75.000. A pesar de los avances en el trasplante de órganos de donantes vivos, una grave escasez de órganos de donante disponibles para estos pacientes sigue siendo el punto crucial del problema. Asimismo, cada campo importante de cirugía reconstructiva llega a la misma barrera de la escasez de tejidos. La cirugía ortopédica, cirugía vascular, cirugía cardíaca, cirugía general, neurocirugía, y las otras, todas comparten este problema fundamental. Por tanto, innumerables pacientes sufren como resultado. Los dispositivos mecánicos proporcionan una solución para tratar la escasez de órganos y tejidos. Los xenoinjertos proporcionan otra solución. Sin embargo, debido a las limitaciones intrínsecas de estas tecnologías, estos enfoques solo son soluciones parciales al problema.

Durante los últimos años, el nuevo campo de la ingeniería de tejidos ha surgido para enfrentarse a esta necesidad. El campo pone juntos la experiencia de médicos, especialistas en ciencias de la vida e ingenieros para resolver los problemas de la generación de nuevos tejidos para trasplante y reconstrucción quirúrgica. La ingeniería de tejidos puede ser una solución completa y permanente al problema de pérdida o fallo de órganos, pero el reto primario de manipular tejidos de órganos vitales es el requisito de un suministro vascular de nutriente y transferencia de metabolitos. Las soluciones iniciales a este problema se describieron en los años 80. Yannas, et al., *Science* 221, 1052 (1981) y Burke, et al., *Ann Surg* 194, 413 (1981), se refieren a métodos de generación de nuevos tejidos *in vivo* implantando materiales no vivos tales como colágenos modificados que se siembran con células para promover la regeneración guiada de tejido tal como piel. Langer, et al., *Science* 260, 920 (1993) y Vacanti, et al., *Materials Research Society* 252, 367 (1992) implican a matrices fibrosas sintéticas a las que se añadieron células específicas de tejido *in vitro*. Las matrices son muy porosas y permiten la transferencia de masa a las células *in vitro* y después de la implantación *in vivo*. Después de la implantación, nuevos vasos sanguíneos crecen dentro de los dispositivos para generar un nuevo tejido vascularizado. Sin embargo, el transcurso de tiempo relativamente largo para la angiogénesis limita el tamaño del tejido recientemente formado.

El campo de la ingeniería de tejidos está experimentando un crecimiento explosivo. Véase, por ejemplo, Vacanti, et al., *Lancet* 354, 32 (1999); Langer, et al., *Science* 260, 920 (1993); Rennie, J. *Scientific American* 280, 37 (1999); y Lysaght, et al., *Tissue Eng* 4, 231 (1998). Se ha estudiado prácticamente cualquier tejido y órgano del cuerpo; muchas tecnologías de ingeniería de tejido están poniéndose a disposición. Véanse Lysaght, et al. *Tissue Eng* 4, 231 (1998); Bell, et al., *Science* 221, 1052 (1981); Burke, et al., *Ann Surg* 194, 413 (1981); Compton, et al., *Laboratory Investigation* 60, 600 (1989); Parenteau, et al., *Journal of Cellular Biochemistry* 45, 24(1991); Parenteau, et al., *Biotechnology and Bioengineering* 52, 3 (1996); Purdue, et al., *J. Burn Care Rehab* 18, 52 (1997); Hansbrough y Franco, *Clinical Plastic Surg* 25, 407 (1998); Vacanti, et al., *Materials Research Society* 252, 367 (1992).

65

Con el tiempo, se han estudiado varias técnicas para manipular tejido vivo nuevo. Las tecnologías incluyen el uso de factores de crecimiento para estimular la cicatrización y regeneración, técnicas de regeneración guiada de tejido usando matrices no vivas para guiar el nuevo desarrollo de tejido, trasplante de células y trasplante de células en matrices. Más recientemente, el nuevo conocimiento en la biología de las células madre ha conducido a estudios de poblaciones de células primordiales, células madre o células madre embrionarias para usar en enfoques de ingeniería de tejidos.

En paralelo a estos avances, el campo rápidamente emergente de Sistemas MicroElectroMecánicos (MEMS) ha penetrado en una matriz de aplicaciones, en áreas tan diversas como automotoras, orientación inercial y navegación, microóptica, detección química y biológica, y, lo más recientemente, ingeniería biomédica, McWhorter, et al. "Micromachining and Trend for the Twenty-First Century", en Handbook of Microlithography, Micromachining and Microfabrication, ed. P. Rai-Choudhury, (Bellingham, WA: SPIE Press, 1997). La tecnología de microfabricación se ha usado en importantes estudios en la biología celular y del desarrollo para entender los complejos eventos de señalización biológica que se producen en la interfase membrana celular-superficie, como se describe, por ejemplo, por Kane, et al., Biomaterials 20, 2363 (1999). También se ha usado en ingeniería de tejidos para guiar el comportamiento celular y la formación de pequeñas unidades de tejido, como se describe por Griffith, et al., Annals of Biomed. Eng., 26 (1998).

Los métodos de microfabricación para MEMS representan una extensión de la tecnología de proceso de obleas semiconductoras originalmente desarrollada para la industria de los circuitos integrados (IC). El control de características hasta el nivel submicrométrico se logra rutinariamente en el procesamiento de IC de elementos de circuitos eléctricos; la tecnología de MEMS traduce este nivel de control en estructuras mecánicas a escalas de longitud que se extienden de menos de 1 micrómetro ( $\mu\text{m}$ ) a más de 1 centímetro (cm). El micromecanizado en a granel estándar permite imprimir patrones de geometría arbitraria en las obleas usando una serie de métodos de grabado sustractivo. Las estructuras tridimensionales pueden realizarse por superposición de estas etapas de proceso usando técnicas de alineamiento preciso. Varios grupos (Griffith, et al., Annals de Biomed. Eng., 26 (1998); Folch, et al., Biotechnology Progress, 14, 388 (1998)) han usado estas matrices de silicio muy precisas para controlar el comportamiento celular y estudiar la expresión génica y las interacciones de la superficie celular. Sin embargo, este enfoque es esencialmente una tecnología bidimensional y no se sabe si puede adaptarse o no a la generación de tejidos tridimensionales gruesos.

El documento PCT US96/09344 por el Instituto de Tecnología de Massachusetts implica a un proceso de impresión tridimensional, una forma de fabricación de forma libre sólida, que construye objetos tridimensionales como una serie de capas. Este proceso usa polvos de polímero en capas unidas por aglutinantes de polímero cuya geometría está impuesta por el diseño y la fabricación asistidos por ordenador. Esta técnica permite arquitecturas internas definidas, que podrían incluir matrices de ramificación de canales que imitan a un suministro vascular. Sin embargo, esta técnica está limitada por las características y la química de los polímeros particulares. Por tanto, limita gravemente los tipos de tejido que van a fabricarse. Por ejemplo, estas paredes de polímero no permiten el intercambio de plasma que se necesita en la pared de capilares alveolares del pulmón.

El documento WO 00/66036 por el Instituto de Tecnología de Massachusetts describe un método y materiales para crear tejido vivo vascularizado complejo en tres dimensiones a partir de un molde microfabricado bidimensional. El uso de una membrana semi-permeable no se desvela en su interior.

Otra limitación de los métodos de ingeniería de tejidos del estado de la técnica está relacionada con el transporte de masa. Las células deben estar dentro de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  de un riego sanguíneo capilar. Las construcciones de ingeniería de tejidos sin un riego sanguíneo desarrollan hipoxia y privación de nutrientes. Sin vasculatura, las células en construcciones mayores de 1-2 mm experimentan necrosis significativa. Hasta la fecha, todos los enfoques en la ingeniería de tejidos se han basado en el crecimiento hacia adentro de vasos sanguíneos dentro de dispositivos de ingeniería de tejidos para lograr la vascularización permanente. Esta estrategia ha funcionado bien para muchos tejidos; sin embargo, no satisface para tejidos complejos gruesos tales como órganos vitales grandes, que incluyen hígado, riñón y corazón. Véase Eiselt, et al., Biotechnol. Prog. 14, 134 (1998). Serían muy deseables nuevos métodos y dispositivos que permitan la producción de estructuras, complejas gruesas, obtenidas por diseño tisular.

#### Objetivos y resumen de la invención

Para vencer los obstáculos conocidos en la técnica, se desarrolló un enfoque para proporcionar estructuras gruesas con vasculatura preexistente antes de la implantación usando técnicas de microfabricación, tales como impresión tridimensional para proporcionar una matriz ordenada de canales de ramificación en un sustrato formado de un material adecuado, tal como silicona o un polímero biocompatible, que entonces se siembra con células. Una circulación vascular de ramificación completa se hace en dos dimensiones sobre la superficie del material usando microfabricación. La estructura bidimensional puede entonces levantarse o separarse de otro modo del molde de silicio y plegarse o enrollarse en una estructura tridimensional compacta.

Las estructuras de tejido laminadas comprenden múltiples capas en las que cada capa comprende tejido y vasculatura ensamblada adyacente la una a la otra por plegamiento y compactación. La vasculatura está en tres dimensiones a través de la estructura y la estructura tiene opcionalmente conexiones para el flujo dentro y fuera de la vasculatura. Las estructuras de tejido laminadas pueden implantarse directamente conectando vasos sanguíneos para que circulen dentro y fuera de la vasculatura. Como tal, la presente invención vence los problemas conocidos en la técnica de la ingeniería de tejidos, que está limitada a la producción de estructuras muy delgadas.

Un objetivo de la presente invención puede ser proporcionar un método y materiales para hacer tejidos vascularizados vivos complejos para la sustitución de órganos y tejidos, especialmente estructuras complejas y/o gruesas, tales como tejido del hígado.

La invención proporciona un aparato para fabricar láminas de tejido en la que el aparato comprende múltiples capas de lámina de tejido apiladas y unidas entre sí, en el que cada capa de lámina de tejido comprende un primer armazón polimérico, una membrana semi-permeable y un segundo armazón polimérico, en el que la membrana semi-permeable está dispuesta entre el primer y el segundo armazones poliméricos, en el que el primer y segundo armazones poliméricos tienen medios que definen microcanales posicionados hacia la membrana semi-permeable, en el que el primer y segundo armazones poliméricos están fijados juntos, y en el que cada uno del primer y segundo armazones poliméricos y la membrana semi-permeable comprenden material que es adecuado para la unión y el cultivo de células de animales. La membrana semi-permeable permite el transporte de moléculas pequeñas, tales como oxígeno, a través de las capas sueltas gruesas, pero no requiere poros reales para el transporte.

Los aparatos de la invención están hechos de capas que comprenden al menos un primer armazón polimérico, un segundo armazón polimérico y una membrana semi-permeable. Estas capas pueden ensamblarse de forma que estén en registro completo (es decir, perfectamente alineadas) o en registro parcial (es decir, imperfectamente alineadas).

El aparato puede estar opcionalmente en comunicación fluida con líneas de suministro y de eliminación por excreción de nutrientes para cultivar células de animales, y puede comprender además un medio de bombeo para hacer circular fluido a través del aparato. La dirección de flujo puede controlarse o dirigirse según se necesite, y puede ser en todas las direcciones. El medio de bombeo puede comprender una jeringa, una bomba peristáltica, o cualquier otro medio de bombeo conocido en la técnica del cultivo de células o de tejido.

La membrana semi-permeable permite el intercambio de gases, la difusión de nutrientes y la eliminación de residuos. El primer armazón polimérico puede comprender la circulación a través de la cual la sangre, plasma o medios con niveles apropiados de oxígeno pueden ser continuamente circulados para alimentar las células/tejido en uno o más moldes y/o armazones poliméricos adicionales. El segundo armazón polimérico puede comprender un depósito para las células funcionales de un órgano, y opcionalmente incluye entradas para inervación neural u otra actividad.

La invención también proporciona un método de preparación de un aparato para fabricar láminas de tejido que comprende las etapas de:

- (a) posicionar una membrana semi-permeable entre un primer y segundo armazones poliméricos, en el que el primer y segundo armazones poliméricos tienen medios que definen microcanales posicionados hacia la membrana semi-permeable, y en el que cada uno del primer y segundo armazones poliméricos y la membrana semi-permeable comprenden material que es adecuado para la unión y cultivo de células de animales;
- (b) fijar el primer y segundo armazones poliméricos juntos de forma que la membrana semi-permeable esté dispuesta entre los armazones poliméricos, formando así un aparato; y
- (c) cultivar células en los microcanales de los moldes y/o armazones poliméricos.

El cultivar células en microcanales comprende

- (i) sembrar células endoteliales dentro de los microcanales del primer armazón polimérico;
- (ii) cultivar las células de animales de (i) en condiciones tales que formen vasos sanguíneos;
- (iii) sembrar células del parénquima dentro de los microcanales del segundo armazón polimérico; y
- (iv) cultivar las células de animales de (ii) en condiciones tales que formen tejido del parénquima.

El aparato y tejidos en su interior pueden opcionalmente conectarse en comunicación fluida con las líneas de suministro y de eliminación por excreción de nutrientes para cultivar células de animales, y el fluido puede hacerse circular adicionalmente a través del aparato por medio de una bomba. La bomba puede comprender una jeringa, una bomba peristáltica, o cualquier otro medio de bombeo conocido en la técnica del cultivo de células o de tejido.

Puede formarse tejido tridimensional levantando suavemente el tejido del armazón polimérico usando técnicas tales como flujo de fluidos y otro material de soporte, según sea necesario. Si el armazón polimérico comprende monómeros biodegradables, la hidrólisis de los monómeros produce la degradación del andamiaje con el tiempo.

El tejido puede plegarse sistemáticamente o enrollarse y compactarse en una estructura vascularizada tridimensional. Esta estructura puede implantarse dentro de animales o pacientes conectando directamente los vasos sanguíneos. Opcionalmente, la membrana semi-permeable puede eliminarse. Se produce la perfusión inmediata de sangre oxigenada, que permite la supervivencia y función de la masa viva entera.

La superficie bidimensional del almacén polimérico también puede variarse para ayudar en el proceso de plegamiento y de compactación. Por ejemplo, la superficie puede cambiarse de plana a plegada en un modo tipo acordeón. Puede apilarse dentro de múltiples placas convergente. Puede ser curvilínea o tener múltiples proyecciones.

Alternativamente, los múltiples almacenes poliméricos pueden apilarse adyacentes los unos a los otros, haciendo múltiples capas vascularizadas de lámina de tejido hasta que se forma la estructura compleja deseada (por ejemplo, equivalente a órgano). Estas estructuras pueden entonces implantarse y, opcionalmente, anastomizarse la vasculatura dentro de la vasculatura existente para proporcionar un riego sanguíneo inmediato para el equivalente a órgano implantado. Alternativamente, estas estructuras comprenden dispositivos de soporte extracorpóreos.

Un método preferido de fabricación de múltiples capas de lámina de tejido en tres dimensiones es formar un aparato posicionando una membrana semi-permeable entre dos almacenes poliméricos, que tienen microcanales posicionados hacia la membrana semi-permeable, y en el que los almacenes poliméricos y la membrana semi-permeable comprenden material que es adecuado para la unión y el cultivo de células de animales. Los almacenes poliméricos se fijan juntos de tal forma que la membrana semi-permeable esté entre ellos. Entonces, las células se cultivan en los microcanales de los almacenes poliméricos para formar lámina de tejido, que se saca del aparato y se pliega o enrolla para formar múltiples capas de lámina de tejido en tres dimensiones.

En otra realización, se crean múltiples capas de lámina de tejido en tres dimensiones formando un aparato de dos almacenes poliméricos y una membrana semi-permeable, como se ha descrito anteriormente, y fijando un tercer almacén polimérico adyacente al primer o segundo almacén polimérico. El tercer almacén polimérico también tiene microcanales, que están posicionados hacia el almacén polimérico adyacente. Una segunda membrana semi-permeable puede separar el tercer almacén polimérico del almacén polimérico adyacente. Los microcanales en capas sucesivas pueden conectarse por orificios de paso para crear una red de canales paralela en tres dimensiones. Las células se cultivan en los microcanales del primer, segundo y tercer almacenes poliméricos para formar tejido tridimensional. Pueden añadirse capas de almacén polimérico adicionales y, opcionalmente, las membranas semi-permeables, para crear tejido más grueso.

Los sistemas y métodos de la invención pueden implantarse en un sujeto para suplementar o sustituir la función biológica de un tejido u órgano. Alternativamente, los sistemas y métodos pueden seguir *ex vivo*, sirviendo de dispositivos extracorpóreos para suplementar o sustituir la función biológica.

Ejemplos de tejidos y órganos que pueden fabricarse usando estos métodos incluyen, pero no se limitan a, órganos actualmente trasplantados tales como corazón, hígado, páncreas, pulmón, riñón e intestino. También podrían manipularse otros tejidos tales como músculo, hueso, mama, tejido reproductivo y neural.

Estas y otras realizaciones se desvelan o son obvias a partir de, y están englobadas por, la siguiente Descripción detallada.

#### Breve descripción de los dibujos

La siguiente Descripción detallada, dada a modo de ejemplo, pero no prevista para limitar la invención a las realizaciones específicas descritas, puede entenderse conjuntamente con las figuras adjuntas, en las que:

- La Figura 1A muestra una oblea de silicio con una red de microcanales.
- La Figura 1B muestra un almacén polimérico con una red de microcanales.
- La Figura 2 muestra un diagrama esquemático de un método de preparación de un almacén polimérico a partir de una oblea de silicio micromecanizada usando moldeo de réplicas por MEMS.
- La Figura 3 muestra un esquema de un proceso de fabricación de fosos en forma de U para hacer un patrón de ramificación sobre obleas de silicio.
- La Figura 4 muestra un esquema más detallado que describe un proceso para la producción de una estructura compleja que comprende canales de profundidades variables.
- La Figura 5 muestra un esquema de un patrón grabado usando un sistema de plasma inductivamente acoplado (ICP).
- La Figura 6 muestra un esquema de una superficie grabada que muestra una estructura de ramificación que se ramifica desde una única entrada y luego converge de nuevo en una única salida.
- Las Figuras 7A, B y C muestran esquemas de una vista en sección transversal de diferentes canales grabados en la superficie de la Figura 6.
- Las Figuras 8A, B y C muestran esquemas de un proceso de preparación de una capa de tejido.

- La Figura 9 muestra un diagrama esquemático de una sección transversal de un aparato para ingeniería de tejidos y soporte de órganos artificiales. El aparato en la Figura 9A comprende un compartimento para el flujo circulatorio (1), una membrana semi-permeable para la transferencia de masa de oxígeno, nutrientes y residuo (2), y un compartimento para células funcionales y el sistema excretor. La Figura 9B muestra el aparato de 9A sembrado con células vasculares o células que forman luz (por ejemplo, conductos biliares) (4) y células funcionales (por ejemplo, hepatocitos) (5).
- La Figura 10 muestra micrografías electrónicas de una membrana semi-permeable hecha usando el procedimiento de TIPS. Las Figuras 10A y 10B muestran la superficie de membrana a 650x y 6500x aumentos, respectivamente. La Figura 10C muestra la membrana en sección transversal a 650x aumentos.
- La Figura 11 muestra un dibujo desde arriba esquemático de un armazón polimérico. Los triángulos representan áreas recubiertas con moléculas de adhesión de células para promover la adhesión de células (por ejemplo, hepatocitos). Las áreas blancas entre los triángulos representan microcanales; en algunas aplicaciones, no están recubiertos con moléculas de adhesión de células, y entonces están abiertos para la colonización por células que pueden formar tejido vascular (por ejemplo, células endoteliales). El círculo negro en el centro de cada hexágono es un orificio pasante vertical.
- Las Figuras 12A-G muestran esquemas de diversas superficies y cómo las capas de tejido podrían ensamblarse a partir de ellas.
- La Figura 13 muestra un esquema de un tejido u órgano complejo ensamblado formado por el proceso de la Figura 8.
- La Figura 14 muestra cómo el órgano de la Figura 5 puede conectarse a un fluido por anastomosis de la entrada y salida.
- La Figura 15 muestra un conjunto de gráficos de barras que demuestran la producción de albúmina continuada por células de hepatocitos cultivadas en un armazón polimérico de la invención. La concentración de albúmina en medio de cultivo se midió cada 24 horas durante 5 días antes del desprendimiento de las células usando un ensayo inmunoenzimático de adsorción. No se observaron diferencias significativas entre el día 2, día 3, y día 4 ( $p < 0,05$  por la prueba de la t para datos emparejados).
- La Figura 16A muestra un patrón de red de ramificación vascular de muestra usado para el micromecanizado de obleas de silicio y Pyrex.
- La Figura 16B muestra la micrografía óptica o porción de la red capilar grabada en la oblea de silicio usando el proceso mostrado en la Figura 3.
- La Figura 16C muestra una micrografía electrónica de barrido de un proceso de grabado anisotrópico usado para formar fosos de paredes laterales en ángulo.
- La Figura 17 muestra fotografías de contraste de fase de hepatocitos pequeños y células no del parénquima cultivadas sobre matraces de cultivo normales. La Figura 17A muestra células en cultivo en el Día 3. La Figura 17B muestra células en cultivo en el Día 5. La Figura 17C muestra células en cultivo en el Día 10. Barra de escala, 100  $\mu\text{m}$  (aumentos originales  $\times 100$ ).
- La Figura 18 muestra una hoja de células levantada de una oblea de silicio. La Figura 18A muestra el aspecto macroscópico y la Figura 18B muestra el aspecto microscópico (aumentos originales  $\times 30$ ).
- La Figura 19 muestra la producción de albúmina por hepatocitos pequeños en el día 3, 5, 7 y 10 ( $\mu\text{g}/\text{día}$ ).
- La Figura 20 muestra tinción de H & E de construcciones implantadas. La Figura 20A muestra construcciones a las 2 semanas. Las flechas indican estructuras de conductillos biliares. La Figura 20B muestra construcciones a 1 mes. Las flechas indican estructuras de conductillos biliares. La Figura 20C muestra construcciones a 2 meses. Se observaron agrupaciones más grandes de hepatocitos de capas de más de cinco células de espesor a 1 y 2 meses. La Figura 20D muestra construcciones a 1 mes. La construcción implantada fue ocupada por las estructuras de conductillos biliares.
- La Figura 21 muestra tinción inmunohistoquímica de construcciones implantadas. La Figura 21A muestra tinción de pan-citoqueratina a 1 mes. La Figura 21B muestra tinción de albúmina a 1 mes. Las flechas indican estructuras de conductillos biliares. La Figura 21C muestra tinción de transferrina a 1 mes. Las flechas indican estructuras de conductillos biliares. La Figura 21D muestra tinción de GGT a 1 mes. Las flechas indican estructuras de conductillos biliares con tinción luminal. Las puntas de flecha indican hepatocitos ligeramente teñidos.
- La Figura 22 muestra tinción de H & E a 1 mes. La flecha indica la estructura de conductillos biliares compuesta de tanto células epiteliales biliares como un hepatocito. Las puntas de flecha indican las estructuras de conductillos biliares compuestas de células epiteliales biliares.
- La Figura 23 muestra microscopía electrónica de transmisión (TEM) de una construcción implantada. (A) Bajos aumentos ( $\times 2500$ ). (B) Altos aumentos ( $\times 15000$ ).
- La Figura 24 muestra el área ocupada por construcciones implantadas ( $\mu\text{g}^2/\text{sección}$ ). El área total y el área de los conductillos biliares se expresan como media  $\pm$  DE.
- La Figura 25 muestra un diagrama esquemático de un aparato micromecanizado para la sustitución renal por ingeniería de tejido. El aparato comprende un compartimento con un filtro endotelial glomerular para el flujo circulatorio (42), una membrana semi-permeable para la transferencia de masa de oxígeno, nutrientes y residuo (44), y un compartimento con un sistema excretor de red de túbulo proximales, que incluye entradas para la filtración de orina (46).
- La Figura 26 muestra una sección transversal de un aparato micromecanizado para la sustitución renal por ingeniería de tejido. El aparato comprende un compartimento con un filtro endotelial glomerular para el flujo circulatorio, una membrana semi-permeable para la transferencia de masa de oxígeno, nutrientes y residuo, y un compartimento con un sistema excretor de red de túbulo proximales, que incluye entradas para la filtración de orina.

Cada capa compartimentalizada del aparato comprende un polímero biocompatible y las capas están separadas por una membrana semi-permeable que comprende un polímero microporoso.

La Figura 27 muestra una sección transversal de un aparato micromecanizado para la sustitución renal por ingeniería de tejido. Se muestra la dirección de flujo del ultrafiltrado glomerular. El flujo se origina en la capa que comprende endotelio glomerular, pasa a través de la membrana semi-permeable a la capa que comprende la red de túbulos proximales en la que se produce la reabsorción.

La Figura 28 muestra una sección transversal de un aparato micromecanizado para la sustitución renal por ingeniería de tejido que comprende múltiples capas apiladas. El aparato comprende unidades apiladas de repetición, comprendiendo cada unidad un compartimento con un filtro endotelial glomerular para el flujo circulatorio, una membrana semi-permeable para la transferencia de masa de oxígeno, nutrientes y residuo, y un compartimento con un sistema excretor de red de túbulos proximales, que incluye entradas para la filtración de orina.

La Figura 29 muestra células microvasculares humanas a los 14 días después de sembrarlas en microcanales.

La Figura 30 muestra células de túbulos proximales que crecen en un almacén polimérico de polidimetil-siloxano (PDMS) aproximadamente 5 horas después de la siembra.

La Figura 31 muestra células de túbulos proximales que crecen en un andamiaje de polidimetil-siloxano (PDMS) de polímero 2 días después de la siembra.

La Figura 32 muestra células de túbulos proximales que crecen en un andamiaje de polidimetil-siloxano (PDMS) de polímero 6 días después de la siembra.

## 20 Descripción detallada

La invención proporciona la construcción de estructuras que comprenden tejido en capas gruesas; que permite la fabricación de un órgano entero, o porción del mismo, que tiene transporte de oxígeno, movimiento de nutrientes y de metabolitos suficiente. Los métodos de la invención emplean un nuevo enfoque de fabricación de tejidos vascularizados tridimensionales para el trasplante en receptores humanos en necesidad de órganos vitales y otros tejidos que requieren un riego sanguíneo. Se fabrica un molde bidimensional (x, y) usando procesos de moldeo de alta resolución, tales como tecnología de obleas micromecanizadas, procesos de resinas fotosensibles gruesas, u otras técnicas, para crear un patrón de canales micromecanizados de pequeña dimensión ("microcanales"), tal que los canales micromecanizados se conecten para la circulación de fluido en el aparato multicapa. Los microcanales pueden comprender, por ejemplo, canales de caras abiertas definidos por paredes que se extienden desde una superficie que define tejido dentro de un sustrato. La invención también engloba un sustrato en el que la superficie que define el tejido comprende un compartimento de caras abiertas definido por paredes que se extienden desde una superficie que define tejido en un sustrato.

Así, la invención proporciona técnicas de aumento de escala de bajo coste para producir órganos, o porciones de los mismos, lo suficientemente grandes como para trasplantarse en un sujeto, tal como receptores animales, normalmente receptores vertebrados, y preferentemente receptores humanos. Un "sujeto" es un vertebrado, preferentemente un mamífero, y lo más preferentemente un ser humano. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, animales de granja, animales para deportes y mascotas. Un experto en la materia puede fácilmente variar los parámetros de los métodos descritos en el presente documento para acomodar huéspedes o sujetos de tamaño variable y especies, que incluyen, pero no se limitan a, seres humanos de cualquier edad.

Las ventajas de la presente invención con respecto a otros métodos de ingeniería de tejidos incluyen (a) la capacidad para producir todas las estructuras tridimensionales de alta resolución requeridas para tejidos complejos y órganos vitales, y (b) la capacidad del molde mecánico (opcionalmente biodegradable) o almacén polimérico para proporcionar soporte para el crecimiento celular y formación de tejido, en vez de la dependencia de factores bioquímicos solos.

Como se usa en el presente documento, los términos "comprende", "que comprende", y similares, pueden tener el significado atribuido a ellos en la ley de patentes de EE.UU. y puede significar "incluye", "que incluye" y similares.

### Fabricación de moldes y armazones poliméricos

Para los fines de la presente invención, un "molde" es un dispositivo sobre la superficie del cual se graba o forma la estructura de ramificación de los microcanales. La fabricación de un molde empieza por la selección de un sustrato apropiado. La elección de un material de sustrato está guiada por muchas consideraciones, que incluyen los requisitos impuestos al proceso de fabricación por las dimensiones del molde deseadas, el tamaño deseado de la plantilla definitiva y las propiedades superficiales de la oblea y su interacción con los diversos tipos de células, matriz extracelular ("ECM") y esqueleto polimérico. También son importantes las propiedades térmicas, tales como la temperatura de transición vítrea (Tg), que debe ser suficientemente alta de manera que la red de poros en el molde no colapse tras la eliminación del disolvente.

Los moldes, como se describen en el presente documento, pueden comprender una variedad de materiales, que incluyen, pero no se limitan a, materiales inertes tales como silicio, polímeros tales como polietileno-acetato de vinilo, policarbonato y polipropileno, y materiales tales como un cerámico o material tal como hidroxiapatita. En particular, el molde puede comprender metales, cerámicos, semiconductores, extractos orgánicos, polímeros y materiales

compuestos. Metales representativos y semiconductores incluyen acero inoxidable de calidad farmacéutica, oro, titanio, níquel, hierro, oro, estaño, cromo, cobre, aleaciones de estos o otros metales, silicio, dióxido de silicio. Estos materiales son tanto inherentemente adecuados para la unión y cultivo de células de animales como pueden hacerse adecuados recubriendo con materiales descritos en el presente documento para potenciar la unión y cultivo de células (por ejemplo, gelatina, Matrigel, Vitrogen y otros recubrimientos de cultivo de tejido conocidos en la técnica).

El moldeo de réplicas por MEMS puede usarse para fabricar un “armazón polimérico” para sembrar células. En este método, se hace un molde como se describe en el presente documento, preferentemente de silicio (Figura 1A), y entonces se usa como plantilla sobre el que se cuele un material polimérico (Figura 2). Opcionalmente, el armazón polimérico puede entonces desprenderse del molde (Figura 1B) y sembrarse con células.

Una “superficie que define tejido” es la superficie de un molde o un armazón polimérico, y un “sustrato” es el molde o armazón del propio polímero.

El término “polímero” incluye polímeros y monómeros que pueden polimerizarse o adherirse para formar una unidad integral. El polímero puede ser no biodegradable o biodegradable, normalmente mediante hidrólisis o escisión enzimática. Las matrices biodegradables no son normalmente preferidas para construir moldes, ya que no se implantan y son preferentemente reutilizables. Para la implantación se usan preferentemente andamiajes poliméricos, más preferentemente armazones poliméricos biodegradables.

En una realización preferida, el armazón polimérico biodegradable comprende elastómeros biodegradables formados de monómeros hidrolizables como se describe en Wang et al, Nature Biotech 20, 602 (2002). Estos elastómeros biodegradables son análogos al caucho vulcanizado porque forman reticulaciones en una red tridimensional de bobinas al azar. Estos elastómeros biodegradables se hidrolizan con el tiempo, preferentemente al cabo de 60 días.

El material de polímero para la implantación debe seleccionarse para la biocompatibilidad. Cualquier producto de degradación debe también ser biocompatible. Es ventajosa rigidez relativamente alta, de manera que el armazón polimérico pueda resistir a las fuerzas de contracción ejercidas por las células que crecen dentro del molde. Un polímero degradable biocompatible y sus productos de degradación son no tóxicos hacia el receptor.

El término “biodegradable” se refiere a materiales que son biorresorbibles y/o se degradan y/o descomponen por degradación mecánica tras la interacción con un entorno fisiológico dentro de componentes que son metabolizables o excretables, durante un periodo de tiempo de minutos a tres años, preferentemente inferior a un año, mientras que se mantiene la integridad estructural requerida. Como se usa en referencia a polímeros, el término “degradar” se refiere a la escisión de la cadena del polímero, tal que el peso molecular permanezca aproximadamente constante al nivel de oligómeros y las partículas de polímero queden tras la degradación. El término “degradar completamente” se refiere a la escisión del polímero al nivel molecular tal que haya pérdida esencialmente completa de masa. El término “degradar”, como se usa en el presente documento, incluye “degradar completamente”, a menos que se indique lo contrario.

Los materiales adecuados para la fabricación de armazones poliméricos incluyen, pero no se limitan a, poli-dimetil-siloxano (PDMS), poli-glicerol-sebacato (PGS), ácido poliláctico (PLA), ácido poli-L-láctico (PLLA), ácido poli-D-láctico (PDLA), poliglicolida, ácido poliglicólico (PGA), polilactida-co-glicolida (PLGA), polidioxanona, poligluconato, copolímeros de ácido poliláctico-poli(óxido de etileno), celulosa modificada, colágeno, polihidroxibutirato, ácido polihidroxipropiónico, polifosfoéster, poli(alfa-hidroxiácido), policaprolactona, policarbonatos, poliamidas, polianhídridos, poliaminoácidos, polioctoésteres, poliacetales, policianoacrilatos, uretanos degradables, poliésteres-poliacrilatos alifáticos, polimetacrilato, acetatos de celulosa sustituidos con acilo, poliuretanos no degradables, poliestirenos, poli(cloruro de vinilo), poli(fluoruro de vinilo), polivinilimidazol, poliolefinas clorosulfonadas, poli(óxido de etileno), poli(alcohol vinílico), teflón RTM, silicio de nailon, y materiales con memoria de forma, tales como poli(estireno-*bloque*-butadieno), polinorborno, hidrogeles, aleaciones metálicas y oligo( $\epsilon$ -caprolactona)diol como segmento de conmutación/oligo(*p*-dioxianona)diol como reticulación física. Otros polímeros adecuados pueden obtenerse por referencia al polímero Handbook, 3ª edición (Wiley, N.Y., 1989). También pueden usarse combinaciones de estos polímeros.

Se han usado polilactida-co-glicolidas (PLGA), además de polilactidas (PLA) y poliglicolidas (PGA) para hacer implantes biodegradables para la administración de fármacos. Véanse la patente de EE.UU. N.º 6.183.781 y las referencias citadas en su interior. Se han desarrollado materiales biodegradables para su uso como prótesis implantables, como pastas y como plantillas alrededor de las cuales el cuerpo puede regenerar diversos tipos de tejido. Los polímeros que son tanto biocompatibles como resorbibles *in vivo* se conocen en la técnica como alternativas a sustitutos autógenos o alógenos. En una realización preferida, los polímeros se seleccionan basándose en la capacidad del polímero para provocar la respuesta biológica apropiada de células, por ejemplo, unión, migración, proliferación y expresión génica.



Se conocen disolventes para la mayoría de los polímeros termoplásticos, por ejemplo, cloruro de metileno u otros disolventes orgánicos. También se conocen disolventes orgánicos y acuosos para polímeros de proteína y de polisacáridos. El aglutinante puede ser el mismo material que se usa en métodos de procesamiento de polvo convencionales o puede diseñarse para dar por último lugar el mismo aglutinante mediante cambios químicos o físicos que se producen como resultado de calentamiento, fotopolimerización o catálisis.

Las propiedades de la superficie del molde y/o armazón polimérico pueden manipularse mediante la inclusión de materiales sobre el molde o en el material de armazón polimérico que alteran la unión celular (por ejemplo, alterando la carga o estructura superficial), porosidad, flexibilidad o rigidez (que puede desearse para facilitar la eliminación de construcciones de tejido). Además, los avances en la química de los polímeros pueden ayudar en las tareas mecánicas de levantar y plegar, además de las tareas biológicas de adhesión y expresión génica.

Por ejemplo, los moldes pueden recubrirse con un polímero sensible a la temperatura único, poli-N-isopropilacrilamida (PNIPAAm), que demuestra una conformación de cadena completamente expandida por debajo de 32 °C y una conformación compacta colapsada a altas temperaturas. Cuando se injerta sobre superficies de obleas de silicio usando irradiación con haces de electrones, puede usarse como un cambio de temperatura para crear superficies hidrófilas por debajo de 32 °C y superficies hidrófobas por encima de 32 °C. Como el PNIPAAm es insoluble en agua con respecto a la temperatura en solución crítica más baja (LCST aproximadamente 32 °C) y se solubiliza reversiblemente por debajo de la LCST, las células se desprenden del sustrato reduciendo simplemente la temperatura por debajo de la LCST. Un experto en la materia puede (1) injertar el polímero sobre obleas de silicio que previamente han sido recubiertas con poliestireno o (2) injertar el polímero sobre obleas de silicio cuya superficie se modifica primero por vinil-triclorosilano. Cualquiera de estas técnicas garantizará que el polímero se integre mejor y se conjugue con su sustrato (poliestireno en el primer caso y grupos vinilo en el segundo caso) de manera que pueda servir de cambio térmico eficaz, útil en invertir la unión y el desprendimiento de células como una única capa contigua de células sin el daño celular usual.

Otro sistema para promover tanto la adhesión celular como el levantar las células como hojas intactas puede implicar el uso de péptidos RGD (Arg-Gly-Asp). La secuencia de RGD es parte del dominio dentro de la molécula de fibronectina que lo dota de la capacidad de interactuar con moléculas de adhesión presentes sobre la superficie celular de fibroblastos. La propia fibronectina es un glucoproteína estructural extracelular bien caracterizada que interacciona fuertemente con otras moléculas de la matriz extracelular y que produce la unión y diseminación de la mayoría de las células. Esta función de la molécula de fibronectina está localizada principalmente en la secuencia de RGD. Un experto en la materia puede sintetizar péptidos RGD con un esqueleto estructural de PMMA que tiene una secuencia de péptidos RGD en sus puntas, unidos entre sí con la capa intermedia de poli(óxido de etileno). Esto permite la adhesión de células diferencial en solo áreas seleccionadas y no otras. Una vez se forma el tejido de calidad deseada, la liberación de esta monocapa intacta de tejido de su sustrato es directa; requiere solo la adición de RGD soluble al medio de cultivo para actuar de sustrato competitivo para el sustrato de RGD insolubilizado sobre la superficie del molde de silicio.

En algunas realizaciones, la unión de las células al armazón polimérico se potencia recubriendo el sustrato con compuestos tales como componentes de la membrana basal, agar, agarosa, gelatina, goma arábiga, colágeno de tipos I, II, III, IV y V, fibronectina, laminina, glucosaminoglicanos, Matrigel, Vitrogen, mezclas de los mismos, y otros materiales conocidos para aquellos expertos en la materia del cultivo celular.

De este modo, a través de los métodos de la invención, las células pueden cultivarse sobre armazones poliméricos fabricados con técnicas de moldeo de replicas.

#### Micromecanizado y procesamiento químico de silicio y otros materiales de molde

Pueden prepararse moldes creando estructuras mecánicas pequeñas en silicio, metal, polímero, y otros materiales usando procesos de microfabricación (Figura 3.) Estos procesos de microfabricación se basan en métodos bien establecidos usados para preparar circuitos integrados y otros dispositivos microelectrónicos, aumentados por métodos adicionales desarrollados por trabajadores en el campo del micromecanizado.

Los procesos de microfabricación que pueden usarse en la preparación de los moldes desvelados en el presente documento incluyen litografía; técnicas de grabado, tales como láseres, grabado por plasma, fotolitografía o grabado químico tal como eliminación química en húmedo, en seco y de resina fotosensible; o por técnicas de forma libre sólida, que incluyen impresión tridimensional (3DP), estereolitografía (SLA), sinterizado selectivo por láser (SLS), fabricación de partículas balísticas (BPM) y modelado por deposición fundida (FDM); por micromecanizado; oxidación térmica de silicio; electrochapado y chapado sin corriente eléctrica; procesos de difusión, tales como difusión de boro, fósforo, arsénico y antimonio; implantación iónica; deposición de películas, tal como evaporación (filamento, haz de electrones, destellos y sombreado y cobertura de escalones), bombardeo iónico, deposición química de vapor (CVD), epitaxia (fase vapor, fase líquida y haz molecular), electrochapado, serigrafía, laminación o por combinaciones de los mismos. Véase Jaeger, Introduction to Microelectronic Fabrication (Addison-Wesley Publishing Co., Reading MA 1988); Runyan, et al., Semiconductor Integrated Circuit Processing Technology (Addison-Wesley Publishing Co., Reading MA 1990); Proceedings of the IEEE Micro Electro Mechanical Systems

Conference 1987-1998; Rai-Choudhury, ed., Handbook of Microlithography, Micromachining & Microfabrication (SPIE Optical Engineering Press, Bellingham, WA 1997). La selección del material que se usa como molde determina cómo la superficie está configurada para formar la estructura de ramificación. Se prefieren los siguientes métodos para la preparación de moldes.

5 Normalmente, el micromecanizado se realiza en obleas de silicio monocristalinas en bloque estándar de un diámetro que oscila entre aproximadamente 50 y 300 milímetros (mm), preferentemente aproximadamente 60 mm, y de espesor que oscila entre aproximadamente 200 y 1200  $\mu\text{m}$ . Estas obleas pueden obtenerse de un gran número de vendedores de material semiconductor estándar, y se sierran y se pulen para proporcionar dimensiones precisas, orientación cristalográfica uniforme y superficies ópticamente planas muy pulidas. Las obleas hechas de borosilicato de Pyrex u otros vidrios también pueden conseguirse e insertarse en los procesos de micromecanizado, usándose procesos alternativos para grabar los materiales vítreos.

15 La geometría del molde, en particular el número de diferentes profundidades características requeridas, es el factor principal que determina la secuencia de proceso específica. El caso más simple es el de una única dimensión de profundidad para el molde. Específicamente, para un sustrato de silicio, la secuencia de proceso (mostrada en la Figura 3) es del siguiente modo: primero, la oblea de silicio se limpia, y se aplica una capa de material fotosensible a la superficie. Normalmente, la capa se centrifuga a una velocidad de alta centrifugación para obtener un recubrimiento de espesor uniforme. La resina fotosensible se hornea, y la oblea se expone entonces a luz ultravioleta u otra luz de longitud de onda corta a través de una máscara semi-transparente. Esta etapa puede llevarse a cabo usando una cualquiera de varias técnicas de enmascaramiento, dependiendo de la resolución de la imagen deseada. La resina sensible se revela entonces en una química de revelador apropiada, y entonces la oblea se endurece por horneado para eliminar el exceso de disolvente de la resina sensible. Una vez se ha completado el proceso litográfico, la oblea puede grabarse en un reactor de plasma usando una de varias químicas posibles. El grabado sirve para transferir el patrón bidimensional en la tercera dimensión: una profundidad especificada dentro de la oblea. Los parámetros del plasma se determinan por la forma deseada del foso resultante (semi-circular, perfil de paredes rectas, paredes laterales en ángulo), además de por la selectividad del agente de grabado por el silicio con respecto a la resina fotosensible de enmascarado. Una vez se ha completado el grabado, la resina fotosensible puede eliminarse y prepararse la oblea para su uso en el proceso de moldeo de tejido.

20 La elevada flexibilidad en la geometría del molde de la oblea puede obtenerse insertando ciclos adicionales de enmascaramiento y grabado, como se muestra en la Figura 4. Aquí, se muestra una segunda etapa en la que una capa de enmascaramiento se ha aplicado, y se han grabado áreas abiertas. Esta modificación proporciona la oportunidad de mecanizar canales de profundidades variables dentro del molde de la oblea. Para diseñar un molde que es adecuado para el cultivo de células endoteliales, la elevada flexibilidad es muy importante debido a la necesidad de ramificaciones vasculares con diferentes diámetros. Las técnicas pueden extenderse para proporcionar tantas capas adicionales y diferentes profundidades como se desee. Además, estas técnicas pueden usarse para crear patrones secundarios dentro del patrón de microcanales. Por ejemplo, puede ser ventajoso tener pocillos dentro de los microcanales para cultivar tipos adicionales de células tales como células nodrizas. El patrón de microcanales también puede diseñarse para controlar el crecimiento celular, por ejemplo, para controlar selectivamente la diferenciación de células.

25 Pueden fabricarse moldes de vidrio y poliméricos de las obleas usando una secuencia similar, pero el proceso real puede modificarse mediante la adición de un lecho de enmascaramiento intermedio, ya que los agentes de grabado para estos materiales también pueden atacar a las resinas fotosensibles. Tales materiales intermedios funcionan simplemente para transferir el patrón de la resina fotosensible a la capa intermedia y entonces a la oblea de debajo. Para el grabado de silicio en una de las varias químicas en húmedo, también puede ser necesaria una capa intermedia.

30 Puede usarse anodización electrolítica del silicio en ácido fluorhídrico acuoso, posiblemente en combinación con luz, para grabar canales dentro del silicio. Variando la concentración de dopaje de la oblea de silicio que va a grabarse, el potencial electrolítico durante el grabado, la intensidad de la luz incidente y la concentración de electrolito, puede lograrse el control de la estructura de poro definitiva. Este proceso usa grabado por plasma profundo de silicio. Las agujas forman un patrón directamente usando fotolitografía, en vez de indirectamente controlando la tensión (como en el grabado electroquímico), proporcionando así mayor control con respecto a la geometría del molde final.

35 En este proceso, un material de enmascaramiento apropiado (por ejemplo, metal) se deposita sobre un sustrato de oblea de silicio y se estampa en puntos que tienen el diámetro de los canales deseados. La oblea se somete entonces a un plasma cuidadosamente controlado basado en químicas de flúor/oxígeno para grabar fosos muy profundos de relación de aspecto alta dentro del silicio. Véase, por ejemplo, Jansen, et al., "The Black Silicon Method IV: The Fabrication of Three-Dimensional Structures in Silicon with High Aspect Ratios for Scanning Probe Microscopy and Other Applications", IEEE Proceedings of Micro Electro Mechanical Systems Conference, pp. 88-93 (1995).

40 Una capa de metal se vapora primero sobre un sustrato plano. Una capa de resina fotosensible se deposita entonces sobre el metal para formar un molde estampado, que deja una región de metal expuesta en forma de

5 agujas. Por electrochapado sobre las regiones expuestas de la capa de siembra de metal, el molde unido por resina fotosensible puede rellenarse con material de electrochapado. Finalmente, se sacan el sustrato y el molde de resina fotosensible, debajo la matriz de molde acabada. Los moldes producidos por este proceso generalmente tienen canales con diámetros en el orden de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  o mayores. Preferentemente, los microcanales tienen un diámetro de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 500  $\mu\text{m}$ . Véase Frazier, et al., "Two dimensional metallic microelectrode arrays for extracellular stimulation and recording of neurons", IEEE Proceedings of the Micro Electro Mechanical Systems Conference, pp. 195-200 (1993).

10 Otro método de formación de moldes de silicio es usando crecimiento epitaxial sobre sustratos de silicio, como se utiliza por Containerless Research, Inc. (Evanston, Illinois, EE.UU.) para sus productos.

15 La distribución de tamaño de la estructura porosa de grabado es muy dependiente de diversas variables, que incluyen, tipo de dopaje y condiciones de iluminación, como se detalla en Lehmann, "Porous Silicon--A New Material for MEMS", IEEE Proceedings of the Micro Electro Mechanical Systems Conference, pp. 1-6 (1996). Pueden formarse moldes de polímero poroso, por ejemplo, por micromoldeo de un polímero que contiene un material volatilizable o lixiviable, tal como una sal volátil, dispersa en el polímero, y entonces volatilizar o lixiviar el material dispersado, dejando una matriz de polímero porosa en forma de molde. Pueden fabricarse moldes huecos, por ejemplo, usando combinaciones de procesos de grabado en seco (Laermer, et al., "Bosch Deep Silicon Etching: Improving Uniformity and Etch Rate for Advanced MEMS Applications", Micro Electro Mechanical Systems, Orlando, F1, USA, (Jan. 17-21, 1999); Despont, et al., "High-Aspect-Ratio, Ultrathick, Negative-Tone Near-UV Photoresist for MEMS", Proc. of IEEE 10th Annual International Workshop on MEMS, Nagoya, Japan, pp. 518-522 (Jan. 26-30, 1997)); creación de micromoldes en polímeros litográficamente definidos y electrochapado selectivo de paredes laterales; o técnicas de micromoldeo directo usando transferencias de moldes de epoxi.

25 Los moldes sólidos pueden sustituirse por una máscara de cromo usando una capa de nitruro de silicio cubierta con cromo. Entonces, los moldes sólidos se graban, el cromo se desnuda y el silicio se oxida. La capa de nitruro de silicio prevendrá la oxidación. Entonces, el nitruro de silicio se desnuda, dejando silicio expuesto y silicio cubierto con óxido en cualquier sitio. La aguja se expone entonces a un plasma de ICP que graba selectivamente el silicio de un modo altamente anisotrópico para formar el orificio interior de la aguja. Un segundo método usa silicio sólido como 'formas' alrededor del cual se depositan estructuras de aguja reales. Después de la deposición, las formas se graban, dando las estructuras huecas. Pueden formarse agujas de sílice o agujas de metal usando diferentes métodos. Las obleas se oxidan entonces a un espesor controlado, entonces se desnuda el nitruro de silicio y el núcleo de silicio se graba selectivamente (por ejemplo, en una solución alcalina húmeda) para formar un molde de sílice hueco.

35 En otra realización, el grabado por iones reactivos profundo se combina con un proceso de silicio negro modificado en un grabador de iones reactivo convencional. Primero, los diseños se estampan mediante resina fotosensible dentro de  $\text{SiO}_2$ , tal como sobre una oblea de silicio. Entonces, el silicio puede grabarse usando grabado por iones reactivos profundo (DRIE) en un reactor de plasma inductivamente acoplado (ICP) para grabar orificios verticales o canales. Entonces se elimina la resina fotosensible. A continuación, una segunda etapa de fotolitografía estampa la capa de  $\text{SiO}_2$  restante. Entonces se elimina la resina fotosensible y la oblea de silicio se graba otra vez completamente por silicio profundo a través de la oblea en las regiones no cubiertas con  $\text{SiO}_2$  (véase la Figura 5). Este proceso puede variarse del siguiente modo. Después de estamparse la oblea, las capas de resina fotosensible y de  $\text{SiO}_2$  se sustituyen por cromo pulverizado por CC de conformación. El segundo grabado por ICP se sustituye por un grabado por plasma de  $\text{SF}_6/\text{O}_2$  en un grabador de iones reactivo (RIE), que produce paredes laterales externas de pendiente positiva. Henry, et al., "Micromachined Needles for the Transdermal Delivery of Drugs", Micro Electro Mechanical Systems, Heidelberg, Germany, pp. 494-498 (Jan. 26-29, 1998). Alternativamente, el silicio puede grabarse anisotrópicamente usando grabado por iones reactivos profundos (DRIE) usando una tecnología de proceso cambiado (A.A. Ayon, S. Nagle, L. Frechette, A. Epstein and M.A. Schmidt, "Tailoring etch directionality in a deep reactive ion etching tool", J. Vac. Sci. Tech. B 18, 1412 (2000)).

50 Pueden formarse formas metálicas por deposición física de vapor de capas metálicas apropiadas sobre formas sólidas, que pueden hacerse de silicio usando las técnicas descritas anteriormente, o que pueden formarse usando otras técnicas de molde estándar tales como repujado o moldeo por inyección. Los metales se eliminan selectivamente usando técnicas de electropulido, en las que un potencial anódico aplicado en una solución electrolítica producirá la disolución de metales debido a la concentración de líneas de campo eléctrico. Una vez las formas de silicio subyacentes se han expuesto, el silicio se graba selectivamente para formar estructuras. Este proceso también podría usarse para hacer estructuras hechas de otros materiales depositando un material distinto de metal sobre las formas de aguja y siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

60 Los moldes formados de dióxido de silicio pueden prepararse oxidando la superficie de las formas del molde de silicio, en vez de depositando un metal y entonces grabando las formas de aguja sólida para dejar las estructuras de dióxido de silicio huecas. En una realización, se proporcionan moldes huecos, porosos o sólidos con ranuras longitudinales u otras modificaciones a la superficie exterior de los moldes.

65

También pueden prepararse moldes poliméricos usando microfabricación. Por ejemplo, los moldes de epoxi pueden prepararse como se ha descrito anteriormente, y pueden aplicarse técnicas de moldeo por inyección para formar las estructuras. Estas técnicas de micromoldeo son relativamente menos caras de reproducir que los otros métodos descritos en el presente documento.

5 La impresión tridimensional (3DP) se describe por Sachs, et al., *Manufacturing Review* 5, 117-126 (1992) y la patente de EE.UU. N.º 5.204.055 a Sachs, et al. La 3DP se usa para crear un objeto sólido imprimiendo por chorro de tinta un aglutinante dentro de áreas seleccionadas de capas de polvo secuencialmente depositadas. Cada capa se crea extendiendo una delgada capa de polvo sobre la superficie de un lecho de polvo. El lecho de polvo es  
10 soportado por un pistón, que desciende tras la extensión del polvo e impresión de cada capa (o, en cambio, los chorros de tinta y el extensor se elevan después de imprimir cada capa y el lecho se queda estacionario). Las instrucciones para cada capa proceden directamente de una representación de diseño asistido por ordenador (CAD) del componente. El área que va a imprimirse se obtiene calculando el área de intersección entre el plano deseado y la representación de CAD del objeto. Los segmentos rebanados individuales o capas se unen para formar la  
15 estructura tridimensional. El polvo sin unir soporta temporalmente porciones no conectadas del componente a medida que la estructura se construye, pero se elimina después de completarse la impresión.

Métodos de SFF distintos de 3DP que pueden utilizarse a cierto grado como se describen en el presente documento son estereolitografía (SLA), sinterización selectiva por láser (SLS), fabricación de partículas balísticas (BPM) y modelado por deposición de fusión (FDM). La SLA se basa en el uso de un láser ultra-violeta (UV) focalizado que es  
20 barrido por vector sobre la parte superior de un baño de un material de polímero líquido fotopolimerizable. El láser de UV hace que el baño polimerice donde el haz de láser golpea la superficie del baño, produciendo la creación de una primera capa de plástico sólido en y justamente por debajo de la superficie. La capa de sólido se baja entonces dentro del baño y el proceso de polimerización generado por el láser se repite para la generación de la siguiente capa, etc., hasta que se obtiene una pluralidad de capas superpuestas que forman el aparato deseado. La capa más  
25 recientemente creada en cada caso se baja siempre a una posición para la creación de la siguiente capa ligeramente por debajo de la superficie del baño de líquido. Se hace un sistema para estereolitografía y se comercializa por 3D Systems, Inc., de Valencia, CA, que es fácilmente adaptable para su uso con materiales poliméricos biocompatibles. SLS también usa un haz de láser focalizado, pero para sinterizar áreas de un polvo de plástico compactado de forma suelta, siendo el polvo aplicado capa por capa. En este método, una delgada capa de  
30 polvo se extiende uniformemente sobre una superficie plana con un mecanismo de rollo. El polvo se barre entonces por trama con un haz de láser de alta potencia. El material de polvo que es golpeado por el haz de láser se funde, mientras que las otras áreas de polvo siguen disociadas. Las capas de polvo sucesivas se depositan y se barren por trama, una encima de la otra, hasta que se completa una parte entera. Cada capa se sinteriza profundamente lo suficiente para enlazarla con la capa precedente. Un sistema adecuado adaptable para su uso en la preparación de  
35 dispositivos médicos está disponible de DTM Corporation de Austin, TX.

BPM usa un aparato de impresión por chorro de tinta en el que la corriente de chorro de tinta del polímero líquido o material compuesto de polímero se usa para crear objetos tridimensionales bajo control por ordenador, similar a la  
40 forma en la que una impresora de chorro de tinta produce impresión gráfica bidimensional. El molde se forma por la impresión de secciones transversales sucesivas, una capa después de la otra, hasta un objetivo usando una soldadura en frío o técnica de solidificación rápida, que produce la unión entre las partículas y las capas sucesivas. Este enfoque como se aplica a metal o materiales compuestos de metal se ha propuesto por Automated Dynamic Corporation of Troy, NY. FDM emplea un trazador x-y con un movimiento de z para posicionar un filamento extruible  
45 formado de un material polimérico, convertido en fluido por calor o la presencia de un disolvente. Está disponible un sistema adecuado de Stratasys, Incorporated de Minneapolis, MN.

El diseño de los canales en el molde puede construirse por varios medios, tales como matemática fractal, que puede convertirse por ordenadores en matrices bidimensionales de ramas y entonces grabarse sobre obleas. Por tanto, los  
50 ordenadores pueden modelar canales vasculares tridimensionales a partir de especímenes de órgano o tejido vivos o preservados, convertir en patrones bidimensionales y entonces ayudar en la reconversión a una estructura vascularizada viva tridimensional. Técnicas para producir los moldes incluyen técnicas para la fabricación de chips por ordenador y tecnologías de microfabricación. Otras tecnologías incluyen técnicas láser.

55 Diseño del aparato

Como se muestra en la Figura 6, en una realización preferida, el patrón en el molde (10), formado de una oblea de silicio (11), empieza con uno o más canales grandes (12), que se ramifican en serie dentro de una matriz grande de  
60 canales tan pequeños como capilares individuales (14a, 14b, 14c, etc.), entonces convergen en uno o más canales grandes (16). La sección transversal del canal "arterial" individual (12) y el canal "venoso" (16) se muestra en la Figura 7A. La sección transversal de la porción de molde (10) que contiene los canales "capilares" (14a, 14b, 14c, etc.) se muestra en la Figura 7B. El molde se muestra en sección transversal en la Figura 7C, con una profundidad de aproximadamente 5 µm.

65 La superficie grabada sirve de plantilla para la circulación de un tejido u órgano individual. Células endoteliales vivas sembradas dentro de estos canales y provistas de flujo de nutrientes y gases apropiados revestirán los canales para

formar vasos sanguíneos. En una realización, como se muestra en la Figura 8A, los trozos de armazón polimérico (30 y 32) se ajustan juntos para hacer un cierre (34), y las células se cultivan. Las células vasculares forman canales vasculares (36) basándose en el patrón grabado en el molde, como se muestra en la Figura 8B. En el Ejemplo 1, se ha demostrado que las células sembradas sobre superficies de silicio y Pyrex establecerán matriz y formarán hojas de tejido del tipo de célula de origen, tanto hepática como endotelial. Una vez formadas y sostenidas por su propia matriz, la parte superior del armazón polimérico (32) puede eliminarse, y las células específicas de órgano o tejido pueden entonces añadirse a la superficie grabada, en la que se unen y proliferan para formar una delgada hoja de tejido vascularizado (36). Como se muestra en la Figura 8C, el tejido pueden entonces levantarse suavemente del armazón polimérico usando técnicas tales como flujo de fluidos y otro material de soporte, según sea necesario. Alternativamente, el polímero puede degradarse. Estas hojas pueden entonces formarse dentro de unidades de tejido tridimensionales. En efecto, la oblea de silicio o Pyrex o el armazón polimérico han actuado de plantilla para la formación de tejido.

En una realización más preferida, como se muestra en la Figura 9A, trozos de armazón polimérico (1 y 3) se ajustan juntos y se separan por una membrana semi-permeable (2). Las células vasculares se siembran dentro de una capa y se cultivan para formar canales vasculares (4) basándose en el patrón grabado en la superficie del molde, como se muestra en la Figura 9B. Las células específicas de órgano o tejido se añaden a la segunda superficie estampada, en la que se unen y proliferan (5) para formar una bicapa de tejido vascularizado. La segunda superficie estampada comprende opcionalmente entradas para incluir opcionalmente entradas para invasión neural, flujo de orina, excreción biliar y otra actividad.

#### Membrana semi-permeable

Puede usarse una membrana semi-permeable para separar el primer armazón polimérico del segundo armazón polimérico en los aparatos microfabricados de la invención. Preferentemente, el tamaño de poro de la membrana es más pequeño que los diámetros de la célula, así, las células no serán capaces de pasar a través (es decir, una baja permeabilidad para las células de animales), mientras que los nutrientes de bajo peso molecular y los fluidos pueden pasar a través (es decir, un alta permeabilidad para los nutrientes), proporcionándose así señalización célula a célula adecuada. Los tamaños de células varían, pero en general están en el intervalo de micrómetros. Por ejemplo, un glóbulo rojo tiene un diámetro de 8  $\mu\text{m}$ . Preferiblemente, el tamaño de poro promedio de la membrana está en una escala submicrométrica para garantizar el cribado eficaz de las células.

Membranas semi-permeables de la presente invención comprenden una amplia matriz de diferentes tipos de membrana y morfologías, que pueden clasificarse del siguiente modo:

- (1) Membranas de grabado por pistas que consisten en orificios de paso cilíndricos en una matriz de polímero densa. Estas membranas normalmente se hacen por grabado iónico; o
- (2) Membranas fibrosas hechas por diversas técnicas de deposición de fibras poliméricas. Mientras que estas membranas no tienen una topología de poros bien definida, los métodos de producción se han refinado suficientemente de manera que las membranas fibrosas tienen cortes de peso molecular específicos.

Se prefieren las membranas de grabado por pistas, ya que limitan el movimiento de fluidos en una dirección. Preferentemente, el movimiento de fluidos es en la dirección vertical. Las membranas fibrosas permiten el movimiento de fluidos tanto lateral como verticalmente.

El desarrollo de una membrana apropiada reflejará la progresión del dispositivo. Pueden incorporarse membranas biocompatibles y no degradables en microcanales que están hechos de poli(dimetilsiloxano) (PDMS). Como el PDMS es no degradable, las membranas tampoco necesitan ser degradables. Sin embargo, también pueden usarse membranas y materiales degradables para los microcanales. Existe una variedad de membranas de grabado por pistas comerciales con tamaños de poro bien definidos que pueden usarse para este fin. Debe tenerse cuidado de incorporar apropiadamente las membranas dentro de los microcanales existentes sin fugas. Para este fin, las membranas pueden unirse con tanto un plasma de oxígeno como un adhesivo basado en silicona. Puede diseñarse una pequeña depresión dentro de los microcanales de manera que la membrana pueda ajustarse apretadamente en su interior.

En principio, la formación de membranas de polímeros se basa en la separación fase-fase. Las interacciones polímero-disolvente son complejas, y los diagramas de fase de los polímeros son significativamente más complicados que aquellos para materiales monoméricos, por ejemplo, metales. La separación de fases puede inducirse tanto por difusión (separación de fases inducida por difusión o "DIPS") como por medios térmicos (separación de fases por inducción térmica o "TIPS").

Un sistema de DIPS comprende polímero, disolvente y no disolvente. La solución de polímero se cuele como una película delgada y entonces se sumerge en un baño de coagulación que contiene el no disolvente. Este proceso está gobernado por la difusión de diversos componentes de bajo peso molecular. El intercambio de disolvente y no disolvente entre la solución de polímero y el baño de coagulación conduce a un cambio en la composición en la película y se induce la separación de fases. Después de algún tiempo, la composición de la fase rica en polímero

alcanza la composición de transición vítrea y el sistema solidifica. Para evitar la formación de macrohuecos, una pequeña cantidad de no disolvente puede mezclarse con la solución de polímero. En una realización preferida, el polímero es policaprolactona (PCL) y el sistema de separación es cloroformo/metanol. Específicamente, se prepara una solución de polímero con una concentración que oscila de aproximadamente el 5-10 % en peso. El PCL se prepara disolviéndolo en cloroformo a temperatura ambiente con agitación suave. Una vez el polímero se ha disuelto completamente, se dispone una pequeña cantidad sobre una superficie de espejo limpia, y se usa una cuchilla de membrana para extender una película con espesor prefijado. El espesor de la película puede ajustarse cambiando el hueco entre la hoja de cuchilla y la superficie del espejo. Una vez la película se ha extendido, el espejo entero se sumerge en un baño de metanol. La separación de fases se produce casi instantáneamente, pero la película y el espejo se dejan en el baño de coagulación durante hasta aproximadamente 10 minutos para fijar la morfología. Un espesor de membrana típico es aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ , y el tamaño de poro está en el orden de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ , preferentemente entre aproximadamente 0,01 y 20  $\mu\text{m}$  (Figura 10). La morfología de membrana puede variarse alterando la composición/concentración de la solución de polímero, el espesor de película, los componentes del baño de coagulación y/o las condiciones de proceso. Un experto en la materia entendería cómo variar uno cualquiera de estos parámetros para lograr el resultado deseado.

Un sistema de TIPS comprende un gradiente térmico para inducir la separación de fases. Eligiendo un sistema de polímero-disolvente que sea miscible a altas temperaturas, pero inmiscible a bajas temperaturas, por ejemplo, temperatura ambiente, la separación de fases puede inducirse tras enfriarse la solución de polímero. En una realización preferida, el polímero es PCL y el sistema de separación es DMF/10 % de  $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ .

Células que van a sembrarse sobre el almacén polimérico

El tejido normalmente incluirá uno o más tipos de células funcionales, mesenquimatosas o del parénquima, tales como células de músculo liso o esquelético, miocitos (células madre de músculo), fibroblastos, condrocitos, adipocitos, fibromioblastos, células ectodérmicas, que incluyen células dúctiles y de la piel, hepatocitos, células de riñón, células de los islotes pancreáticos, células presentes en el intestino, y otras células del parénquima, osteoblastos y otras células que forman hueso o cartílago, y células hematopoyéticas. En algunos casos también puede desearse incluir células nerviosas. La vasculatura normalmente se formará a partir de células endoteliales. "Células del parénquima" incluyen los elementos funcionales de un órgano, como se distinguen de la trama o estroma. "Células mesenquimatosas" incluyen tejidos conjuntivos y de soporte, músculo liso, endotelio vascular y glóbulos sanguíneos.

Las células pueden obtenerse por biopsia o recogerse de un donante vivo, cultivo celular, o autopsia, todas las técnicas muy conocidos en la técnica. Las células son preferentemente autólogas. Las células que van a implantarse pueden disociarse usando técnicas convencionales tales como digestión con una solución de colagenasa, tripsina u otra proteasa, y entonces se siembran dentro del almacén polimérico inmediatamente o después de mantenerse en cultivo. Las células pueden ser normales o manipularse genéticamente para proporcionar función adicional o normal. También pueden usarse células inmunológicamente inertes, tales como células embrionarias o fetales, células madre, y células genéticamente manipuladas para evitar la necesidad de inmunosupresión. Métodos y fármacos para la inmunosupresión son conocidos para aquellos expertos en la técnica del trasplante.

Pueden usarse células precursoras no diferenciadas o parcialmente diferenciadas, tales como células germinativas embrionarias (Gearhart, et al., patente de EE.UU. N.º 6.245.566), células madre embrionarias (Thomson, patentes de EE.UU. N.º 5.843.780 y 6.200.802), células madre mesenquimatosas (Caplan, et al., patente de EE.UU. N.º 5.486.359), células madre neurales (Anderson, et al., patente de EE.UU. N.º 5.849.553), células madre hematopoyéticas (Tsukamoto, patente de EE.UU. N.º 5.061.620), células madre adultas multipotentes (Furcht, et al., documento WO 01/11011) en la presente invención. Las células pueden mantenerse en un estado no diferenciado por co-cultivo con una capa nodriza de fibroblastos (Thomson, patentes de EE.UU. N.º 5.843.780 y 6.200.802), o por cultivo libre de nodrizas con medio acondicionado con fibroblastos (Xu, et al. Nat. Biotechnol., 19, 971 (2001)). Pueden inducirse células precursoras no diferenciadas o parcialmente diferenciadas hasta una vía de desarrollo particular por cultivo en medio que contiene factores de crecimiento u otros factores de inducción específicos del tipo de célula o agentes conocidos en la técnica. Algunos ejemplos de tales factores se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Ejemplos seleccionados de agentes inductores de la diferenciación

Agente	Progenitor	Célula diferenciada
Factor de crecimiento endotelial vascular	Célula madre embrionaria	Célula hematopoyética <sup>1</sup>
Hedgehog sónico	Placa del piso	Neurona motora <sup>2</sup>
Factor de crecimiento similar a la insulina II	Célula madre embrionaria	Mioblasto <sup>3</sup>
Osteogenina	Osteoprogenitor	Osteoblasto <sup>4</sup>
Factor de diferenciación de linfocitos T citotóxicos	Célula del bazo	Linfocito T citotóxico <sup>5</sup>
$\beta$ -catenina	Célula madre de piel	Queratinocito folicular <sup>6</sup>
Proteína morfogénica ósea 2	Célula madre mesenquimatosas	Adipocitos, osteoblastos <sup>7</sup>

Agente	Progenitor	Célula diferenciada
Interleucina 2	Precursor de la médula ósea	Linfocitos citolíticos espontáneos <sup>8</sup>
Factor de crecimiento transformante $\beta$	Fibroblasto cardíaco	Miocito cardíaco <sup>9</sup>
Factor de crecimiento nervioso	Célula cromafín	Neurona simpática <sup>10</sup>
Factor de Steel	Cresta neural	Melanocito <sup>11</sup>
Interleucina	Progenitor mesencefálico	Neurona dopaminérgica <sup>12</sup>
Factor de crecimiento de fibroblastos 2	GHFT	Lactótropo <sup>13</sup>
Ácido retinoico	Leucemia promielocítica	Granulocito <sup>14</sup>
Wnt3	Célula madre embrionaria	Célula hematopoyética <sup>15</sup>

<sup>1</sup>Keller, et al. (1999) Exp. Hematol. 27:777-787.  
<sup>2</sup>Marti, et al. (1995) Nature. 375:322-325.  
<sup>3</sup>Prelle, et al. (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 277:631-638.  
<sup>4</sup>Amedee, et al. (1994) Differentiation. 58:157-164.  
<sup>5</sup>Hardt, et al. (1985) Eur. J. Immunol. 15:472-478.  
<sup>6</sup>Huelsken, et al. (2001) Cell. 105:533-545.  
<sup>7</sup>Ji, et al. (2000) J. Bone Miner. Metab. 18:132-139.  
<sup>8</sup>Migliorati, et al. (1987) J. Immunol. 138:3618-3625.  
<sup>9</sup>Eghbali, et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88:795-799.  
<sup>10</sup>Nijijima, et al. (1995) J. Neurosci. 15:1180-1194.  
<sup>11</sup>Guo, et al. (1997) Dev. Biol. 184:61-69.  
<sup>12</sup>Ling, et al. (1998) Exp. Neurol. 149:411-423.  
<sup>13</sup>Lopez-Fernandez, et al. (2000) J. Biol. Chem. 275:21653-60.  
<sup>14</sup>Wang, et al. (1989) Leuc. Res. 13:1091-1097.  
<sup>15</sup>Lako, et al. (2001) Mech. Dev. 103:49-59.

- Una célula madre puede ser cualquiera conocida en la técnica, que incluye, pero no se limita a, células madre embrionarias, células madre adultas, células madre neurales, células madre de músculo, células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimatosas, células madre de sangre periférica y células madre cardíacas. Preferentemente, la célula madre es humana. Una "célula madre" es una célula pluripotente, multipotente o totipotente que puede someterse a división celular de auto-renovación para dar lugar a células hija fenotípica y genotípicamente idénticas durante un tiempo indefinido y, por último, pueden diferenciarse en al menos un tipo de célula final.
- 5
- 10 La célula madre por excelencia es la célula madre (ES) embrionaria, ya que tiene potencial de auto-renovación y de diferenciación multipotente y / o pluripotente ilimitado, así que posee la capacidad de desarrollarse en cualquier órgano, tipo de tejido o tipo de célula. Estas células pueden derivar de la masa celular interna del blastocisto, o pueden derivar de las células germinativas primordiales de un embrión post-implantación (células germinativas embrionarias o células EG). Las células ES y EG se han obtenido de ratones, y más recientemente también de primates no humanos y seres humanos. Evans et al. (1981) Nature 292:154-156; Matsui et al. (1991) Nature 353:750-2; Thomson et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92:7844-8; Thomson et al. (1998) Science 282:1145-1147; y Shambloott et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726-31.
- 15
- Los términos "células madre", "células madre embrionarias", "células madre adultas", "células progenitoras" y "poblaciones de células progenitoras" deben entenderse como que significan, según la presente invención, células que pueden derivar de cualquier fuente de tejido u órgano adulto y pueden replicarse como células no diferenciadas o células comprometidas a linaje y tienen el potencial de diferenciarse en al menos uno, preferentemente múltiples, linajes celulares.
- 20
- 25 Los hepatocitos añadidos al aparato de la invención pueden ser hepatocitos muy proliferativos, conocidos como hepatocitos pequeños (SHC), que tienen la capacidad de proliferar *in vitro* durante largos periodos de tiempo (Mitaka, et al., Biochem Biophys Res Commun 214,310 (1995); Taneto, et al, Am J Pathol 148, 383 (1996)). Los hepatocitos pequeños expresan funciones específicas de hepatocitos tales como la producción de albúmina (Mitaka, et al., Hepatology 29, 111 (1999)). Se demostró la supervivencia y función de los hepatocitos pequeños cuando se co-cultivan sobre moldes biodegradables microporosos de polímero tridimensionales bajo condiciones de cultivo dinámicas (Ejemplo 4).
- 30

Métodos de siembra de células dentro de armazones poliméricos

35 *Siembra de células*

Después de preparar el molde con el alto grado deseado de micromecanizado, los armazones poliméricos se siembran con las células deseadas o conjuntos de células. La distribución de células en todo el armazón polimérico puede influir en tanto (1) el desarrollo de una red vascularizada como (2) la satisfactoria integración del dispositivo vascular con el huésped. El enfoque usado en la presente invención es proporcionar un mecanismo para la

40

distribución ordenada de células sobre el almacén polimérico. Pueden usarse células que están enriquecidas en moléculas de la matriz extracelular o en péptidos que potencian la adhesión celular. Pueden sembrarse células sobre el o almacén polimérico de una manera ordenada usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, Teebken, et al., Eur J. Vasa Endovasc. Surg. 19, 381 (2000); Ranucci, et al., Biomaterials 21, 783 (2000). Por tanto, los dispositivos de ingeniería tisular pueden mejorarse sembrando células a través de los almacenes poliméricos y permitiendo que las células proliferen *in vitro* durante una cantidad de tiempo predeterminada antes de la implantación, usando los métodos de Burget al., J Biomed. Mater. Res 51, 642 (2000).

Para los fines de la presente invención, las "células de animales" pueden comprender células endoteliales, células del parénquima, células de la médula ósea, células hematopoyéticas, células de músculo, osteoblastos, células madre, células mesenquimatosas, células madre, células madre embrionarias o fibroblastos. Las células del parénquima pueden derivar de cualquier órgano, que incluye corazón, hígado, páncreas, intestino, cerebro, riñón, tejido reproductivo, pulmón, músculo, médula ósea o células madre.

En una realización, el almacén polimérico se siembra primero con una capa de células del parénquima, tales como hepatocitos o células de túbulos proximales. Esta capa puede mantenerse en cultivo durante una semana o así con el fin de obtener un duplicado de la población. Puede mantenerse en un biorreactor de perfusión para garantizar el suministro de oxígeno adecuado a las células en el interior. El aparato se siembra entonces con una capa de células endoteliales y se cultiva adicionalmente. En regiones en las que la matriz se resorbe rápidamente, el tejido puede expandirse y llegar a ser infiltrado en los capilares.

*Siembra de células de capa horizontal por flujo laminar.*

Para los fines de la presente invención, una estructura que comprende almacenes poliméricos unidos o fijados, con o sin una membrana semi-permeable entre ellos, se denomina "aparato". Los conjuntos de células pueden añadirse a o sembrarse dentro de los aparatos tridimensionales, que pueden servir de plantilla para la adhesión y el crecimiento de células por las células añadidas o sembradas. Las células añadidas o sembradas pueden ser células del parénquima, tales como hepatocitos o células de los túbulos proximales. También pueden usarse células madre. Puede añadirse un segundo conjunto de células, tales como células endoteliales, a o sembrarse sobre el aparato ensamblado mediante otros vasos distintos de aquellos usados para sembrar el primer conjunto de células. La siembra de células se realiza por flujo lento. Como cuestión práctica, la geometría del aparato determinará los caudales. En general, las células endoteliales pueden entrar en y formar paredes de vasos en canales micromecanizados que tienen aproximadamente 10-50  $\mu\text{m}$ . Así, además de servir de trama mecánica para el órgano, el aparato ensamblado proporciona una plantilla para toda la complejidad microestructural del órgano, de manera que las células tienen un mapa mecánico para situarse ellas mismas y formar subsistemas, tales como vasos sanguíneos en el hígado.

Opcionalmente, las células funcionales se siembran dentro de tanto un primer como un segundo almacén polimérico con microcanales sobre sus superficies, y los dos almacenes poliméricos se unen o fijan con una membrana semi-permeable entre ellos, que permite el intercambio de gas, la difusión de nutrientes y la eliminación de residuos.

Una capa comprende la circulación a través de la cual sangre, plasma o medios con niveles apropiados de oxígeno pueden circular continuamente para alimentar la segunda capa. La segunda capa comprende un depósito para las células funcionales de un órgano, y opcionalmente incluye entradas para la inervación neural, flujo de orina, excreción biliar u otra actividad. Esto produce un aparato de fabricación de láminas de tejido, en el que cada uno del primer y segundo almacenes poliméricos y la membrana semi-permeable comprenden material que es adecuado para la unión y el cultivo de células de animales. La hoja de tejido creada por los aparatos y/o métodos de la invención se denomina "lámina de tejido".

Los canales en la dirección horizontal normalmente avanzan de más grandes a más pequeños a más grandes. Las geometrías pueden ser tan complejas según se desee en plano (dirección horizontal). Así, pueden usarse geometrías pequeñas en plano (tales como conductos horizontales de aproximadamente 5-20  $\mu\text{m}$ ). El alineamiento de los orificios de paso crea conductos verticales o canales en el eje z. Sin embargo, los canales verticales no necesitan ir de más grandes a más pequeños a más grandes. En la dirección vertical, los canales verticales normalmente son paralelos entre sí y tienen diámetros en el nivel de micrómetros, solo suficientemente grandes para permitir la siembra de células (por ejemplo, los hepatocitos tienen aproximadamente 40  $\mu\text{m}$ ). En una realización, los diferentes tipos de células se siembran horizontalmente sobre diferentes capas del aparato ensamblado. En otra realización, los diferentes tipos de células se siembran usando poros o canales de diferentes direcciones. También son posibles diversas combinaciones (véase la Figura 11).

Aunque se describe en el presente documento con particular referencia a la formación de tejido vascularizado, debe entenderse que los canales pueden usarse para formar luces para el paso de una variedad de diferentes fluidos, no solo sangre, sino también bilis, linfa, nervios, orina y other líquidos corporales, y para la regeneración guiada o el crecimiento de otros tipos de células, especialmente células nerviosas. La capa de tejido puede incluir algunas luces para formar vasculatura y algunas para otros fines, o ser para un fin, normalmente proporcionar un riego sanguíneo para llevar oxígeno y nutrientes a y de las células en el tejido.



Moléculas tales como factores de crecimiento u hormonas pueden unirse covalentemente a la superficie de los armazones poliméricos y/o membrana semi-permeable para efectuar el crecimiento, división, diferenciación o maduración de células cultivadas encima.

5 Construcción de tejido o equivalentes de órgano

10 La lámina de tejido manipulada puede plegarse y compactarse sistemáticamente en una estructura vascularizada tridimensional, como se muestra en las Figuras 12 y 13. La superficie bidimensional del molde puede variarse para ayudar en el proceso de plegamiento y de compactación. Por ejemplo, la superficie puede cambiarse de plana a plegada tipo acordeón. Puede apilarse dentro de múltiples placas convergentes. Podrían ser curvilíneas o tener múltiples proyecciones.

15 Diferentes tipos de tejido, o múltiples capas del mismo tipo de tejido, pueden superponerse antes del plegamiento y la compactación, para crear estructuras más complejas o más grandes. Por ejemplo, un sistema tubular puede disponerse en capas sobre un sistema vascular para fabricar tejido glomerular y túbulos colectores para los riñones. Los tubos de los conductos biliares pueden revestirse sobre tejido de hígado o hepatocito vascularizado, para generar un sistema de drenaje de conductos biliares. El tejido alveolar o de las vías respiratorias puede disponerse sobre capilares de pulmón para crear nuevo tejido de pulmón. Pueden añadirse nervios o ganglios linfáticos usando variaciones de estas mismas técnicas generales.

20 Las Figuras 12A-G son vistas en perspectiva de formas en las que una sola lámina de tejido (Figura 12A) puede plegarse (Figuras 12B y 12C) o apilarse (Figura 12D), o expandirse para formar una forma de globo (Figura 12E), embudo (Figura 12F), o luz grande (Figura 12G).

25 Además de las realizaciones en las que se forma una sola capa de tejido, el aparato mostrado en la Figura 9 puede usarse para la formación de tejido y órgano tridimensional. La adición del segundo armazón polimérico permite añadir la unidad funcional del órgano, y asimismo permite precisión para el estampado de flujo de salida exocrino. Por ejemplo, en el hígado, las células del parénquima son hepatocitos y el sistema exocrino es el sistema biliar. Mediante la adición del segundo compartimento que contiene hepatocitos y células biliares, el tejido funcional del hígado puede lograrse y la excreción biliar puede diseñarse y envolverse.

30 Este estampado puede hacerse más complejo con la adición de capas adicionales separadas por membranas permeables. Varios armazones poliméricos, con o sin membranas semi-permeables entre ellos, pueden apilarse en matrices racionales para producir tejido complejo en el espacio tridimensional (véase la Figura 28, por ejemplo). Estas capas de armazones poliméricos, y opcionalmente, membranas semi-permeables, pueden encajarse apropiadamente y conectarse (por ejemplo, mediante orificios de paso) para producir conexiones vasculares a través de las profundidades de la pila, además de los sistemas de flujo de salida excretor a través de las profundidades de los tractos.

40 Apilamiento de moldes y/o armazones poliméricos para lograr la tridimensionalidad.

45 La extensión de la tecnología bidimensional dentro de la tercera dimensión puede llevarse a cabo por apilamiento de las capas bidimensionales una encima de la otra. Este método de apilamiento empieza con muchos armazones poliméricos producidos por las técnicas descritas en secciones previas. Una vez se crean estos armazones poliméricos (nominalmente del mismo tamaño), se tienden o unen a otros armazones poliméricos separados, encima de otro. Las capas pueden conectarse por orificios de paso, que se extienden a través del eje z de los armazones poliméricos. El patrón de microcanales sobre la superficie de cada armazón polimérico puede ser diferente o ser similar a la capa previa, dependiendo de las consideraciones mecánicas de fluidos. Además de los canales bidimensionales incorporados en cada capa, los orificios de paso pueden proporcionar estructuras de vaso que se extienden hasta dentro de la tercera dimensión (vertical). Cada capa sucesiva podría tener patrones ligeramente diferentes de orificios de paso, de manera que el efecto sería tener vasos que se extienden en la tercera dimensión que no son necesariamente precisamente perpendiculares al plano de la hoja.

50 Por extensión de esta tecnología según se necesite, puede moverse de la formación que presentemente puede lograrse de pequeñas ( $\sim 100 \text{ cm}^2$ ) hojas de tejido, cada uno de las cuales contiene un plano de vasos sanguíneos, a la formación de quizás  $100 \text{ cm}^3$  de material, suficiente para construir un órgano. El proceso es de bajo coste, escalable, puede ser personalizado para la fisiología de un paciente particular, y se basa en la tecnología de microfabricación actualmente disponible.

60 Fijación de las capas apiladas.

65 Un aspecto de la presente invención es la fijación o el sellado de las capas de molde poliméricas. Preferentemente, las capas se unen irreversiblemente antes de la implantación dentro del huésped. Dependiendo de la composición del material en capas, las capas pueden sellarse por unión con disolvente; volver a fluir por calentamiento ( $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ); tratando la superficie con plasma de oxígeno; o por flujo de polímero en la superficie. Los materiales de polímero biocompatibles pueden unirse juntos por activación por plasma para formar estructuras selladas (Jo et al., SPIE

3877, 222 (1999)). El proceso básico produce capas unidas con arquitectura de canal que se parece mucho a la obtenida con los moldes de grabado de silicio.

Cámaras microfluídicas de silicio-vidrio para probar el sellado de pilas

5 Se han realizado pruebas microfluídicas que demuestran que los aparatos unidos son impermeables y soportan presiones de fluido necesarias para la siembra dinámica de células (véase el Ejemplo 3). Uno de los métodos más comunes usados para sellar obleas micromecanizadas juntas es la unión anódica, una técnica basada en la alta concentración de iones móviles en muchos vidrios (Camporese, et al., IEEE Electron. Device Lett. EDL 2, 61(1981)).  
10 Este proceso produce un sellado permanente; la prueba de fractura de interfases anódicas unidas de silicio-vidrio produce un fallo dentro de la masa del vidrio.

15 Las obleas grabadas pueden unirse juntas, produciendo luces cerradas adecuadas para los experimentos fluidicos. Se realizó una prueba fluidica con un flujo de fase mixto de alcohol con microesferas fluorescentes de 10 µm. Se perforó mecánicamente una capa de recubrimiento de vidrio sin grabar para los puertos de fluido de entrada y salida, y entonces se unió anódicamente a una oblea de silicio grabada con plasma con la geometría TEP-1. Se produjo un sellado permanente sin fugas, permitiendo obtener datos de presión y de flujo muy precisos.

20 Alternativamente, el dispositivo multicapa de la invención puede configurarse tal que cada una de las capas tenga una hendidura de alineamiento sobre una superficie de la capa y una protuberancia de alineamiento sobre la superficie opuesta de la otra capa. Las hendiduras de alineamiento se moldearon para encajarse con la protuberancia de alineamiento, de manera que las capas se mantengan juntas.

Métodos alternativos de apilamiento

25 Para formar las capas de armazón polimérico por ensamblaje mecánico, las capas pueden encajarse mecánicamente usando barbas, pernos, tornillos, pinzas, grapas, alambres, hilo o suturas biodegradables o no biodegradables (véase la patente de EE.UU. N.º 6.143.293.) Con este enfoque de ensamblaje mecánico, cada sección prefabricada puede comprender diferentes microestructuras de material de armazón polimérico. Pueden sembrarse diferentes secciones de éstas con células antes del ensamblaje. Así, las células pueden incorporarse dentro del armazón polimérico ensamblando secciones alrededor de estos componentes. Además, las características superficiales sobre cada molde, que se fabrican fácilmente, llegan a ser parte de la microestructura interna (por ejemplo, canales de superficies moldeadas se convierten en conductos para la infusión de células, o para la circulación sanguínea para estimular la angiogénesis). Una característica superficial sobre un armazón polimérico individual llegará a ser una característica interna cuando otro segmento se ensamble sobre él. Por ejemplo, características superficiales tales como los canales pueden micromecanizarse dentro de una primera capa de armazón polimérico. Cuando una segunda capa de armazón polimérico se coloca encima de una primera capa, la característica superficial micromecanizada llega a ser una característica interna del aparato.

Enrollado o plegamiento para lograr la tridimensionalidad

40 Un método alternativo para lograr la tridimensionalidad es generar una larga tira de material de molde de polímero, que contiene unidades de repetición de la red de vasos sanguíneos junto con orificios de paso, y plegar la película de molde en un modo de z veces mientras que los orificios de paso se alinean entre sí.

45 El proceso de enrollado o plegamiento empieza con la generación de una tira larga de material de molde de polímero, que contiene una matriz en serie de células unitarias cada una de las cuales comprende una matriz de canales que imitan a la red vascular, producida a partir de un molde de la oblea moldeando, repujando, o similares. Estas células unitarias pueden ser idénticas o pueden ser diferentes. Las unidades están conectadas a orificios de paso que proporcionan las conexiones de canales verticales entre las capas de vasos sanguíneos horizontales. Una vez se ha formado la tira de andamiaje polimérico, se pliega en un modo de z veces (Figura 12C), y se unen juntas de manera que cada pliegue se una a las porciones de película por encima y por debajo de ella con alineamiento a los orificios de paso.

55 Este rollo puede tener una longitud que proporcione material de andamiaje suficiente para un órgano humano entero, que puede ser de cientos, o incluso más, múltiplos del área de una sola oblea. Cada sección del rollo es una hoja de molde polimérico con luces cerradas, o vasos. Los vasos en cada sección de hoja plegada están conectados con un orificio pasante en el borde de la hoja (por ejemplo, uno en cada lado, para la circulación sanguínea de entrada y de salida). Durante el plegamiento, las secciones de la hoja se pliegan, de tal manera que las aberturas del orificio pasante se alineen, formando un vaso en la tercera dimensión (z).

60 El rollo puede estar en forma de una espiral, hélice, rodillo de gelatina u otros objetos de forma cilíndrica (véase la Figura 12).

65 Las estructuras de tejido tridimensional descritas pueden entonces implantarse dentro de animales o pacientes conectando directamente los vasos sanguíneos al flujo dentro de y fuera del aparato, como se representa en la

Figura 14. Se produce la perfusión inmediata de sangre oxigenada, que permite la supervivencia y función de la masa viva entera.

5 En una realización, se forma hígado diseñado por ingeniería tisular. Preferentemente, el hígado diseñado por ingeniería tisular comprende tanto hepatocitos funcionantes como conductos biliares (véase la Figura 9B). El sistema biliar del hígado nativo empieza con un canalículo biliar hexagonal diminuto, que se forma a partir de la especialización de las superficies adyacentes de hepatocitos individuales, que se sellan con empalmes ajustados. Estos canalículos son confluentes con ductulos biliares terminales, que se hacen inicialmente de células escamosas, pero ceden a epitelio biliar cuboidal bajo a medida que se aproximan a los conductos biliares interlobulares. Se secreta un litro de bilis por día por los hepatocitos y sale del hígado a través de este sistema. Ha habido informes previos de formación de estructuras similares a conducto en una variedad de cultivos de hepatocito *in vitro* e *in vivo* a largo plazo (Block, et al., J Cell Biol, 132, 1133 (1996); Landry, et al., J Cell Biol, 101, 914 (1985); Mitaka, et al., Hepatology 29, 111 (1999); Nishikawa, et al., Exp Cell Res, 223, 357 (1996); Uyama, et al., Transplantation 55, 932 (1993)). En el Ejemplo 4 se muestra que el tejido de hígado diseñado por ingeniería, cultivado en canales microfabricados de un molde de una sola capa, comprende estructuras que se parecen a conductos biliares.

20 En otra realización más, se forma riñón diseñado por ingeniería tisular. Preferentemente, el riñón diseñado por ingeniería tisular comprende túbulos proximales funcionales. El riñón diseñado por ingeniería tisular funciona como un riñón nativo; el ultrafiltrado glomerular fluye desde el endotelio glomerular y pasa a través de una membrana semipermeable al interior de una red de túbulos proximales en la que se produce la reabsorción (véase el Ejemplo 5).

#### Dispositivos de soporte extracorpóreo

25 La invención puede adaptarse para comprender dispositivos para sus usos, además de la formación de tejido implantable. Tales dispositivos pueden ser extracorpóreos, y pueden proporcionar función de soporte parcial, pueden prolongar el tiempo entre los tratamientos hospitalarios para pacientes en terapias de soporte de órganos crónicas, y mejorarán la calidad de vida entre tratamientos hospitalarios. Los actuales dispositivos extracorpóreos conocidos en la técnica no incorporan las precisas capacidades de microfabricación ofrecidas por la tecnología MEMS y, por tanto, la función está limitada por los límites de resolución de los actuales métodos de fabricación de fibra hueca y de membranas. Se espera que la inserción de tecnología de MEMS dentro de este dominio tenga beneficios importantes para el hemofiltrado, la diálisis y otras aplicaciones. Por ejemplo, los diseños pueden adaptarse para producir un dispositivo de diálisis renal extracorpóreo, un dispositivo de hígado extracorpóreo, o un dispositivo de pulmón artificial extracorpóreo. Tales dispositivos pueden o pueden no estar soportados con células vivas cargadas o sembradas dentro del dispositivo.

40 Los sistemas de la invención pueden implantarse en un sujeto para complementar o sustituir la función biológica de un tejido u órgano. Alternativamente, los sistemas pueden permanecer *ex vivo*, sirviendo de dispositivos extracorpóreos para suplementar o sustituir la función biológica. Como se usa en el presente documento, el término "función biológica" se refiere a la actividad estructural, mecánica o metabólica de un tejido u órgano. Los dispositivos extracorpóreos de la presente invención pueden comprender dispositivos híbridos adecuados para uso tanto *ex vivo* como *in vivo*.

45 Los ejemplos presentados en el presente documento demuestran que la tecnología de microfabricación puede adaptarse para adecuarse a las necesidades de todos los tejidos vivos. Un aspecto importante de la presente invención se centra en su control de forma con respecto a distancias extremadamente pequeñas. La resolución de las técnicas de microfabricación está en el orden de aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$  de punto a punto. Este nivel de precisión añade nuevos niveles de control en la capacidad para diseñar y guiar la formación de tejido nuevo. Por ejemplo, las superficies pueden imprimirse con ranuras o fileteados de submicrómetros, y las esquinas pueden hacerse redondeadas, en ángulo o afiladas con este mismo nivel de precisión en submicrómetros. El control geométrico en esta escala puede tener un poderoso impacto sobre la adhesión celular mediante mecanismos tales como orientación por contacto, como se describe por Den Braber, et al. J. Biomed. Mater. Res. 40, 291 (1998).

55 Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la invención, y no debe considerarse que limiten su alcance de ningún modo.

#### Ejemplo 1

60 Micromecanizado de plantilla para canales vascularizados ramificados por ingeniería de tejidos para la fabricación de hígado.

65 Se usaron tecnologías de micromecanizado sobre superficies de silicio y Pyrex para generar sistemas vasculares completos que pueden integrarse con tejido diseñado por ingeniería antes de la implantación. Los patrones de fosos reminiscentes de la arquitectura ramificada de redes vasculares y de capilares se grabaron usando técnicas fotolitográficas estándar sobre superficies de silicio y de Pyrex para servir de plantillas. Se cultivaron hepatocitos y células endoteliales y posteriormente se levantaron como monocapas de células individuales de estos moldes

bidimensionales. Ambos tipos de células fueron viables y proliferativos sobre estas superficies. Además, los hepatocitos mantuvieron la producción de albúmina. Las monocapas levantadas se plegaron entonces en tejidos tridimensionales compactos. El objetivo es levantar estas redes vasculares ramificadas de plantillas bidimensionales de manera que puedan combinarse con capas de tejido del parénquima, tales como hepatocitos, para formar conformaciones tridimensionales de tejido vascularizado vivo para la implantación.

## Materiales y métodos

### *Técnicas de micromecanizado*

Se fabricaron plantillas para la formación de hojas de tejido vascularizado vivo utilizando tecnología de micromecanizado. Para el presente trabajo, se utilizó un grabado de nivel único para transferir un patrón de red vascular dentro de una matriz de fosos conectados en la superficie de tanto obleas de silicio como de Pyrex.

En este prototipo, se seleccionó una geometría simple para estampar la red vascular. Cerca del borde de cada oblea se dispuso una entrada o salida única, con una anchura de 500  $\mu\text{m}$ . Después de una longitud corta, la entrada y salida se ramificó en tres canales más pequeños de anchura 250  $\mu\text{m}$ ; cada uno de estos se ramificó otra vez en tres canales de 125  $\mu\text{m}$ , y finalmente hasta tres canales de 50  $\mu\text{m}$ . Los canales se extienden de canales de 50  $\mu\text{m}$  para formar una red de capilares, que comprende el volumen de la disposición. Entre estas redes de entrada y salida se encuentra un patrón embaldosado de diamantes y hexágonos que forma un lecho de capilares y que llena el espacio entero entre la entrada y la salida. En una configuración, la anchura de capilares se estableció a 25  $\mu\text{m}$ , mientras que en otra los capilares se fijaron a 10  $\mu\text{m}$ . Esta geometría se seleccionó debido a su simplicidad, además de su aproximación irregular a las escalas de tamaño de la arquitectura de ramificación del hígado. La disposición de esta red se llevó a cabo usando el software CADENCE (Cadence, Chelmsford, Massachusetts) en una estación de trabajo Silicon Graphics. Se generó un archivo con la disposición y se envió electrónicamente a Align-Rite (Burbank, California), en donde se produjeron las placas de vidrio con patrones generados por haces de electrones que reproducían la geometría de la disposición, y se devolvieron para el procesamiento litográfico.

Los materiales de partida para la fabricación de plantillas por ingeniería de tejidos fueron obleas de silicio de calidad para semiconductor estándar (Virginia Semiconductor, Powhatan, Virginia) y obleas de Pyrex estándar (Bullen Ultrasonics, Eaton, Ohio) adecuadas para procesamiento por MEMS. Las obleas de silicio tuvieron 100 mm de diámetro y 525  $\mu\text{m}$  de espesor, con planos primarios y secundarios cortados dentro de las obleas para señalar la orientación del cristal. La orientación del cristal fue  $\langle 100 \rangle$ , y las obleas se doparon con boro a una resistividad de aproximadamente 5 W-cm. La superficie delantera se pulió dando un acabado óptico y la superficie trasera se pulverizó dando un acabado mate. Las obleas de Pyrex fueron de composición idéntica a Corning 7740 (Corning Glass Works, Corning NY), y también tuvieron 100 mm de diámetro, pero tuvieron un espesor de 775  $\mu\text{m}$ . Tanto las superficies delantera como trasera se pulieron dando un acabado. Antes del micromecanizado, ambos tipos de oblea se limpiaron en una mezcla de 1 parte de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 1 parte de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 20 minutos a 140  $^\circ\text{C}$ , se aclararon 8 veces en agua desionizada con una resistividad de 18 MW, y se secaron en una corriente de gas  $\text{N}_2$  caliente.

Para las obleas de silicio y de Pyrex se empleó fotolitografía estándar como máscara de grabado para la formación de fosos. El grabado de obleas de Pyrex requiere la deposición de una capa intermedia para la transferencia de patrones que es insensible a la química de grabado. Se utilizó una capa de polisilicio de espesor 0,65  $\mu\text{m}$  sobre el Pyrex para este fin. Esta capa se depositó usando deposición química de vapor de baja presión (LPCVD) a 570  $^\circ\text{C}$  y 500 mTorr mediante el método de descomposición de silano estándar. En el caso del silicio, la resina fotosensible sola podría resistir exposición limitada a dos de las tres químicas de grabado empleadas. Para la tercera química, una capa de 1,0  $\mu\text{m}$  de dióxido de silicio se depositó térmicamente a 1100  $^\circ\text{C}$  en hidrógeno y oxígeno.

Una vez se limpiaron las obleas y se prepararon para el procesamiento, las imágenes de la arquitectura de ramificación prototipo se tradujeron sobre las superficies de la oblea usando técnicas litográficas MEMS estándar. Una única capa de resina fotosensible (Shipley 1822, MicroChem Corp., Newton, Massachusetts) se centrifugó sobre las superficies de la oblea a 4000 rpm, proporcionando un espesor de película de aproximadamente 2,4  $\mu\text{m}$ . Después del horneado a 90  $^\circ\text{C}$  durante 30 minutos, la capa de resina fotosensible se expuso a luz UV usando un alineador de máscara de Karl Suss MA6 (Suss America, Waterbury, Vermont). Se pasó luz a través de la placa litográfica descrita antes, que estaba en contacto físico con la oblea recubierta. Este método duplica el patrón sobre la placa a una exactitud de 0,1  $\mu\text{m}$ . Tras la exposición, las obleas se revelaron en Shipley 319 Developer (MicroChem Corp., Newton, Massachusetts), y se aclararon y se secaron en agua desionizada. Finalmente, las obleas se hornearon a 110  $^\circ\text{C}$  durante 30 minutos para endurecer la resina sensible, y se expusieron a un plasma de oxígeno con 80 vatios de potencia durante 42 segundos para eliminar trazas de resina sensible de áreas abiertas.

Las obleas de silicio se grabaron usando tres químicas diferentes, mientras que las obleas de Pyrex se procesaron usando solo una técnica. Para el Pyrex, el patrón litográfico aplicado a la capa intermedia de polisilicio se transfirió usando una breve exposición (aproximadamente 1 minuto) a  $\text{SF}_6$  en un sistema de plasma de grabado por iones reactivos (Surface Technology Systems, Newport, Reino Unido). Se eliminó la resina fotosensible, y el patrón impreso en la capa de polisilicio se transfirió dentro de los fosos en el silicio usando una mezcla de 2 partes de  $\text{HNO}_3$  a 1 parte de HF a temperatura ambiente. Con una tasa de grabado de 1,7  $\mu\text{m}$  por minuto, se grabaron fosos de 20

µm de profundidad en las obleas de Pyrex en aproximadamente 12 minutos. Como la química es isotrópica, a medida que se graban los fosos, se vuelven más anchos. El procesamiento con el patrón de disposición con 25 µm de ancho de los fosos capilares tendió a producir la fusión de los canales, mientras que el uso de fosos de 10 µm de ancho evitó este fenómeno. El análisis interferométrico de los canales después del grabado mostró que la rugosidad superficial era inferior a 0,25 µm. Una vez se completó el grabado de canales de obleas de Pyrex, se eliminó el polisilicio con una mezcla de 10 partes de HNO<sub>3</sub> a 1 parte de HF a temperatura ambiente, y las obleas volvieron a limpiarse en 1 parte de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1 parte HF.

Se emplearon tres químicas diferentes para grabar el silicio con el fin de investigar la interacción entre la geometría de los canales y el comportamiento de las células. Primero, se usó una química de grabado con plasma anisotrópica estándar usando una mezcla de SF<sub>6</sub> y C<sub>4</sub>F<sub>8</sub> en un sistema de plasma de proceso cambiado a partir de STS<sup>24</sup>, para producir fosos rectangulares en silicio. Los fosos más estrechos son fosos más superficiales que profundos debido a un fenómeno conocido como retraso de RIE. Un segundo proceso utilizó un sistema de plasma diferente de STS, que produce fosos isotrópicos con un perfil en forma de U. Mientras que el proceso es isotrópico, el ensanchamiento de los fosos no es tan grave como se experimenta en el proceso de grabado de Pyrex isotrópico descrito antes. En ambos de estos casos de grabado con plasma, los fosos se grabaron a una profundidad nominal de 20 µm. Para el tercer proceso, el grabado anisotrópico en KOH (45 % en peso/peso en H<sub>2</sub>O a 88 °C), se empleó la capa de dióxido de silicio intermedia mencionada anteriormente. Primero, la capa de dióxido de silicio se estampó usando grabado con HF a temperatura ambiente. El proceso de KOH produce paredes laterales en ángulo en vez del perfil rectangular o perfil en forma de U producido por las dos primeras formulaciones, respectivamente. Los planos cristalinos en la orientación <111> se revelan a lo largo de las paredes laterales en ángulo, debido a propiedades anisotrópicas del proceso de grabado con KOH en función de la orientación del cristal. Debido a la naturaleza auto-limitante de los canales producidos por este proceso, la profundidad del foso se limitó a 10 µm. Después de completarse el grabado de la oblea de silicio, todas las capas de resina fotosensible y dióxido de silicio se eliminaron, y las obleas se limpiaron en 1 parte de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : 1 parte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 140 °C, seguido de aclarado en agua desionizada y secado en gas nitrógeno.

Para este conjunto de experimentos, no se hizo intento por alterar la química superficial de las obleas de silicio y de Pyrex. Antes del procesamiento, las obleas de silicio eran uniformemente hidrófobas, mientras que las obleas de Pyrex fueron igualmente hidrófilas, como se ha determinado por observaciones de la formación de hojas de líquido y de gotas inmóviles. Después del procesamiento, pareció que las superficies sin grabar retuvieron estas características, pero no se determinó la química superficial dentro de los canales.

#### *Animales*

Se usaron ratas Lewis macho adultas (Charles River Laboratories, Wilmington, MA), que pesaban 150-200 g, como donantes de células. Los animales se alojaron en el animalario del Hospital General de Massachusetts según las pautas de los NIH para el cuidado de animales de laboratorio. Se les permitió pienso para ratas y agua a voluntad y se mantuvieron en un ciclo de 12 horas de luz y oscuridad.

#### *Aislamientos de células*

Se usaron ratas Lewis macho como donantes de células hepáticas. Se aislaron HC usando una modificación del procedimiento de perfusión de colagenasa de dos etapas como se describe previamente por Aiken, et al., J Pediatr Surg 25, 140 (1990) y Seglen, Methods Cell Biol 13, 29 (1976). Brevemente, los animales se anestesiaron con solución de nembutal sodio (Abbott Laboratories, North Chicago, IL), 50 mg/kg, y el abdomen se preparó de modo estéril. Se hizo una incisión abdominal en la línea central y la vena cava inferior infrahepática se canuló con un angiocatéter de 16 de calibre (Becton Dickinson). Se hizo una incisión en la vena porta para permitir la salida retrógrada y se ligó la vena cava inferior suprahepática. La perfusión se realizó a un caudal de 29 ml/min inicialmente con una solución de tampón libre de calcio durante 5 a 6 minutos, entonces con un tampón que contenía colagenasa tipo 2 (Worthington Biomedical Corp., Freehold, NJ) a 37 °C. El hígado se extirpó después de la digestión adecuada de la matriz extracelular y se agitó mecánicamente en medio E de William (Sigma, St. Louis, MO) con suplementos para producir una suspensión de células individuales. La suspensión se filtró a través de una malla de 300 µm y se separó en dos fracciones por centrifugación a 50 g durante 2 minutos a 4 °C. El sedimento que contenía la fracción de HC viable se resuspendió en medio E de William y se purificó adicionalmente por una centrifugación de isodensidad de Percoll. El sedimento resultante se resuspendió entonces en medio de crecimiento de hepatocitos, y las cifras de células y las viabilidades de HC se determinaron usando la prueba de exclusión con azul de tripano.

Las células endoteliales se derivaron de microvasos de pulmón de rata y se compraron directamente del vendedor, Vascular Endothelial Cell Technologies (Rensselaer, NY).

#### *Medio de cultivo de hepatocitos*

Se usaron medio de E de William complementado con 1 g de piruvato de sodio (Sigma, St. Louis, MO) y 1 % de glutamina-penicilina-estreptomina (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) durante el proceso de aislamiento de células. El

medio de chapado fue medio Eagle modificado por Dulbecco (Gibco BRL) complementado con 10 % de suero bovino fetal, 1 % de penicilina-estreptomicina, bicarbonato sódico 44 mM, HEPES 20 mM, niacinamida 10 mM, 30 microgramos/ml de L-prolina, ácido ascórbico 1 mM, 2 fosfato, dexametasona 0,1  $\mu$ M (Sigma), insulina-transferrina-selenito de sodio (5 mg/l-5 mg/l-5  $\mu$ gramos/l, Roche Molecular Biomedicals, Indianápolis, IN) y 20 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA).

#### *Medio de cultivo de células endoteliales*

Se complementó medio Eagle modificado por Dulbecco (Gibco BRL) con 10 % de suero bovino fetal, 1 % de penicilina-estreptomicina, 25 mg de ácido ascórbico (Sigma), 10 mg de L-alanina (Sigma), 25 mg de L-prolina (Sigma), 1,5 microgramos de sulfato cúprico (Sigma), glicina (Sigma) y solución de tampón Hepes 1 M (Gibco BRL). Los medios se complementaron con 8 mg de ácido ascórbico cada día.

#### *Unión y levantamiento de células de obleas de silicio y de Pyrex no grabadas*

Se probaron silicio y Pyrex como posibles sustratos para el cultivo y la elevación de células endoteliales y hepatocitos. Antes de la siembra de las células, las obleas de Pyrex se esterilizaron con 70 % de etanol (Fisher, Pittsburg, PA) durante la noche y se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato estéril (Gibco BRL). Las obleas de silicio se pusieron primero en remojo en acetona durante 1 h, seguido de un aclarado en metanol durante 15 minutos, y esterilización durante la noche en 100 % de alcohol isopropílico. Se cultivaron células endoteliales microvasculares de pulmón de rata sobre superficies de Pyrex y de silicio no recubiertas, además de obleas recubiertas con Vitrogen (30 microgramos/ml), Matrigel® (1 %) o gelatina (10 mg/ml). Una vez aisladas, las células se resuspendieron en medio de cultivo de células endoteliales, se sembraron uniformemente sobre la oblea a una densidad de  $26,7 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> y se cultivaron al 5 % de CO<sub>2</sub> y 37 °C. Después de alcanzar la confluencia, la capacidad de la monocapa de células endoteliales para levantarse de las obleas se probó usando un raspador de células para promover el desprendimiento.

También se cultivaron hepatocitos de rata sobre Pyrex y silicio no recubiertos, además de obleas recubiertas con capas delgadas y gruesas de Vitrogen (30 microgramos/ml y 3 microgramos/ml) y Matrigel (1 %) con el fin de determinar los métodos óptimos para levantar las hojas de hepatocitos. Una vez aislados, los hepatocitos se resuspendieron en medio de crecimiento de hepatocitos, se sembraron sobre la oblea a una densidad de  $111,3 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> y se cultivaron a 5 % de CO<sub>2</sub> y 37 °C. Se observó diariamente la unión y el crecimiento de células usando microscopía y el levantamiento de las células se produjo espontáneamente.

Después de determinar qué método de cultivo era el menor para levantar los hepatocitos y células endoteliales en una capa intacta, ambas membranas se fijaron en 10 % de formalina tamponada durante 1 h y se recogieron para el estudio histológico, y los hepatocitos se tiñeron inmunohistoquímicamente.

#### *Tinción inmunohistoquímica*

La membrana de monocapa de células de hepatocito se fijó en 10 % de formalina tamponada y se procesó para la tinción con hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica usando un método de estreptavidina-biotina marcada (kit LSAB2 para espécimen de rata, DAKO, Carpintería, CA). El anticuerpo primario fue anti-albúmina de conejo (ICN, Costa Mesa, CA). Se prepararon secciones de tres micrómetros y se desparafinaron. Los especímenes se trataron con tampón de bloqueo de peroxidasa (DAKO) para prevenir la tinción no específica. Las secciones se tiñeron con albúmina diluida con solución salina tamponada con fosfato, seguido de anticuerpo anti-conejo biotinilado y estreptavidina conjugada con HRP. Las secciones se trataron con DAB como sustrato y se contratiñeron con hematoxilina.

#### *Producción de albúmina*

Para evaluar la función de los hepatocitos, se midió la concentración de albúmina en el medio de cultivo cada 24 horas durante 5 días antes del desprendimiento de células usando un ensayo inmunoanalítico de adsorción (n=5), como se describe por Schwere, et al., Clinica Chemica Acta 163,237 (1987). En resumen, se recubrió una microplaca de 96 pocillos con anticuerpo anti-albúmina de rata (ICN). Después de bloquear respuestas no específicas con una solución al 1 % de gelatina, cada muestra se sembró sobre la placa y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Esto fue seguido de otra 1 hora de incubación con anticuerpo anti-albúmina de rata conjugada con peroxidasa (ICN). Finalmente, el sustrato se añadió y la extinción se midió con un lector de microplacas a 410 nm. R<sup>2</sup> de la curva patrón fue >0,99. Los resultados demuestran la producción continua de albúmina por hepatocitos cultivados (Figura 15).

#### *Análisis estadístico*

Todos los datos se expresaron como media  $\pm$  DE. El análisis estadístico se realizó con una prueba de la t para datos emparejados. La significación estadística se determinó como cuando el valor de p de cada prueba fue inferior a 0,05.

*Unión de células a obleas de silicio y de Pyrex grabadas*

También se sembraron células endoteliales y hepatocitos sobre obleas de silicio y de Pyrex grabadas. Antes de la siembra de las células, las obleas de Pyrex se esterilizaron con 70 % de etanol (Fisher) durante la noche y se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato estéril (Gibco BRL). Las obleas de silicio se pusieron primero en remojo en acetona durante 1 h, seguido de un aclarado en metanol durante 15 minutos, y esterilización durante la noche en 100 % de alcohol isopropílico. Sobre estas obleas se sembraron células endoteliales microvasculares de pulmón de rata a una densidad de  $26,7 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>, o hepatocitos de rata a una densidad de  $111,3 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>. Estas células se cultivaron al 5 % de CO<sub>2</sub> y 37 °C, y su unión y crecimiento se observaron diariamente usando microscopía.

*Implantación de hojas de hepatocitos en el epiplón de rata*

Se cultivaron hepatocitos sobre obleas de silicio recubiertas con una delgada capa de Vitrogen (30 microgramos/ml), y se levantaron en hojas. La retrorsina es un fármaco que se sabe que inhibe la regeneración del hígado normal produciendo un bloque en el ciclo celular de los hepatocitos con una acumulación de células en la fase tardía S y/o G<sub>2</sub> (Peterson JE J Pathol Bacteriol 89, 153 (1965)). Este fármaco se administró dentro de la cavidad peritoneal de dos ratas a una dosis de 3 mg/ml/100 g en el día 0, y después de dos semanas. Tres semanas después, se creó una derivación portocava, y a la semana siguiente una hoja de hepatocitos, levantada después de cuatro días cultivo sobre silicio recubierto con Vitrogen (30 microgramos/ml), se implantó en la microvasculatura del epiplón de la rata y se enrolló en un cilindro tridimensional, y se realizó un 60 % de hepatectomía. El epiplón enrollado con hepatocitos se recogió a las cuatro semanas y a los tres meses después de la implantación y se analizó usando histología.

Resultados*Micromecanizado*

Un esquema del diseño de la red de ramificaciones vasculares usado como plantilla para el micromecanizado se muestra en la Figura 16A. Este patrón se transfirió a obleas de silicio y de Pyrex usando los procesos descritos en la sección de materiales y métodos. Se lograron profundidades de los fosos típicas de 20 µm en silicio y 10 µm en vidrio utilizando estos procesos. Una micrografía óptica de una porción de la red de capilares grabada dentro de una oblea de silicio se muestra en la Figura 16B. En la Figura 16C se muestra una sección transversal de micrografía de barrido electrónica de un foso en ángulo grabado usando el proceso de grabado anisotrópico descrito anteriormente. Este proceso produjo excelente adhesión y levantamiento potenciado de tejido vivo.

*Crecimiento y levantamiento de células de las obleas de silicio y de Pyrex*

Se compararon la adhesión y el crecimiento de células endoteliales y hepatocitos sobre varias superficies de sustrato diferentes. En todas las obleas de Pyrex, las células endoteliales recubiertas o no recubiertas proliferaron y crecieron hasta la confluencia en el plazo de cuatro días. Estas células no se levantaron espontáneamente, y cuando se rasparon, no se levantaron como una hoja única. Además, cuando las obleas de silicio no recubiertas se sembraron con células endoteliales, la hoja de células se fragmentó tras la elevación. Por otra parte, las células endoteliales sembradas sobre las superficies de silicio recubiertas con Vitrogen (30 microgramos/ml), Matrigel (1 %) y gelatina (10 mg/ml) se levantaron con el uso de medios mecánicos (es decir, un raspador de células), y proporcionaron una hoja en monocapa intacta de células endoteliales. Tras la observación, no hubo diferencias significativas en los efectos de los tres recubrimientos sobre las hojas de células desprendidas.

También se unieron hepatocitos y se extendieron bien sobre todas las obleas de Pyrex recubiertas y no recubiertas, y no se levantaron espontáneamente o en hojas cuando se rasparon después de varios días de crecimiento. Sin embargo, cuando se sembraron sobre obleas de silicio, se levantaron espontáneamente sobre todas las obleas no recubiertas y recubiertas. Las hojas de hepatocitos se levantaron de las obleas no recubiertas después de 3 días, pero fueron muy frágiles y se segmentaron fácilmente. Las monocapas que se levantaron de los sustratos de Vitrogen delgados y gruesamente recubiertos (30 microgramos/ml y 3 microgramos/ml) se levantaron después de 4 días en cultivo para formar una capa de hepatocitos intacta. Las células se levantaron de las obleas de silicio recubiertas con Matrigel (1 %) después de 5 días en cultivo. No hubo diferencias significativas en el aspecto entre las hojas de células levantadas de las obleas recubiertas de Vitrogen y de Matrigel.

La evaluación histológica de las monocapas de células desprendidas de tanto hepatocitos como células endoteliales manifestaron resultados prometedores. La tinción con hematoxilina y eosina (H&E) de ambas mostró que todas las células fueron viables y que la mayoría estuvieron experimentando mitosis. Se observó que las células endoteliales se atenuaban principalmente y formaban un alineamiento de células individuales. La monocapa de hepatocitos mostró que cada célula era una configuración esferoide con citoplasma floculento eosinófilo y un gran núcleo con un nucléolo rojo brillante, similar al observado en el hígado nativo. Además, las uniones celulares estuvieron menos atenuadas que las células endoteliales. Así, estos resultados son reminiscentes de cada una de las funciones específicas de los tipos de células. En sistemas biológicos, el endotelio funciona proporcionando una superficie externa lisa delgada de una barrera y un canal de transporte y así es entendible que aquí se observe que estas

células son principalmente atenuadas y en una matriz de una sola célula. Los hepatocitos tienen más tendencia a formar tejido y así menos a una matriz de una sola célula y se observa más de una matriz multi-capa redondeada.

La secreción de albúmina en el medio de cultivo de hepatocitos en el día 2, 3, 4 y 5 fue  $165,96 \pm 29,87$ ,  $164,44 \pm 17,22$ ,  $154,33 \pm 18,46$ ,  $115,47 \pm 18,09$  (microgramos/día, Gráfico 1), respectivamente. Aunque hubo una diferencia estadísticamente significativa entre el día 4 y el día 5, no se observaron diferencias significativas entre el día 2, el día 3 y el día 4 ( $p < 0,05$  por la prueba de la t de datos emparejados). Por tanto, estos datos muestran que las células cultivadas sobre obleas de silicio fueron capaces de mantener una velocidad de producción de albúmina casi constante hasta el día 4.

Además, mediante la tinción inmunohistoquímica de las monocapas de hepatocitos desprendidas, muchas células se tiñeron positivas para albúmina, indicando además que la función de los hepatocitos se mantuvo sobre las obleas de silicio.

#### 15 *Implantación de hoja de hepatocitos dentro del epiplón de rata*

La tinción con H&E de hojas de hepatocitos implantadas en el epiplón de la rata demostró que todas las células fueron viables y mostraron proliferación a las cuatro semanas y a los tres meses. Las hojas de monocapas de hepatocitos implantadas, cuando se recogieron, fueron capas de más de 5 células de espesor en la mayoría de las áreas.

Este estudio demuestra que la tecnología de microfabricación de silicio puede utilizarse para formar hojas más grandes de tejido vivo. También demuestra la factibilidad de grabar matrices de ramificación ordenadas de canales que permiten a las células endoteliales vivas revestir la superficie luminal de los canales. Además, se ha mostrado que las hojas organizadas de tejido de hepatocito y tejido endotelial manipulados por ingeniería pueden levantarse de la superficie de obleas de silicio o de Pyrex y puede plegarse en una configuración tridimensional compacta. Las hojas de hepatocitos se han puesto entonces dentro de ratas sobre la superficie altamente vascular del epiplón. Esa estructura se ha enrollado entonces en un cilindro tridimensional como un modelo de una vasculatura manipulada por ingeniería. Se formó tejido hepático vascularizado como injerto permanente.

#### 30 Ejemplo 2

Redes microvasculares endotelializadas cultivadas sobre plantillas de Pyrex® micromecanizadas para ingeniería de tejidos de órganos vitales

Este ejemplo muestra el diseño, modelado y prueba experimental/ por ordenador de las matrices microvasculares endotelializadas cultivadas sobre plantillas de Pyrex® micromecanizadas.

Se grabaron patrones de redes microvasculares usando tecnologías de microfabricación sobre obleas de Pyrex®. El patrón consistió en 10 generaciones de bifurcaciones de un canal de entrada único de anchura 3 mm hasta canales de anchura de 30 µm.

Los canales se juntaron entonces en una salida única. Todos los canales se grabaron a la misma profundidad de 30 µm. La oblea de Pyrex® se selló a una hoja de caucho de silicona plana del mismo tamaño. Las células endoteliales recogidas de un pulmón de rata se sembraron satisfactoriamente y se expandieron bajo condiciones de flujo continuo en esta red microvascular. Los glóbulos rojos recogidos de la rata se heparinizaron y se perfundieron dentro de los canales endotelializados, y se recogieron satisfactoriamente en la salida. Usando técnicas de microvisualización, se midió la concentración de glóbulos rojos (hematocrito) en la red microvascular. También se calculó la distribución del caudal de sangre, presión y hematocrito en el sistema microvascular entero usando un algoritmo por ordenador anteriormente desarrollado.

Se observó que células epiteliales circulaban a través de los canales y se unían principalmente alrededor de las paredes de canales más pequeños en el día 1 y que crecían hasta confluencia a lo largo de los canales bajo condiciones de flujo continuo durante los 5 días siguientes. Células endoteliales de pulmón de rata se unen en una única capa a las paredes de estas estructuras de molde sin ocluir las.

El hematocrito se comparó bien entre las mediciones experimentales y los cálculos numéricos. Los glóbulos rojos alcanzan incluso los vasos más pequeños en la red, asegurando el transporte sostenido de oxígeno a los capilares manipulados por ingeniería.

En resumen, la tecnología de microfabricación se demuestra como un enfoque para organizar células endoteliales *in vitro* a la escala de tamaño de la microcirculación.

#### 65 Ejemplo 3

Dispositivo de microfluídica para la microvasculatura manipulada por ingeniería de tejidos: Cultivo celular endotelial



En este ejemplo se demuestra la fabricación del molde microfluídico, la siembra *in vitro* y el cultivo celular extendido en el molde. Se fabricaron redes de capilares en PDMS biocompatible, se esterilizaron, se recubrieron con moléculas de adhesión de células y se sembraron con células. Los moldes que contenían las células se conectaron entonces a un biorreactor de bucle cerrado para el cultivo a largo plazo. Se logró el cultivo de flujo continuo de células endoteliales durante hasta 4 semanas sin oclusión o contaminación.

Se usaron microfluídicos de litografía blanda tradicional como matriz prototipo. Estos microfluídicos que contienen células son capaces de soportar el cultivo a largo plazo *in vitro*, debido a que la expansión *in vitro* de células antes de la implantación puede durar varias semanas. La matriz prototipo se diseña para suministrar oxígeno suficiente y nutrientes y para eliminar productos excretorios mientras que se evitan tensiones de cizallamiento grandes. La matriz es útil para el cultivo celular microfluídico a largo plazo, que incluye el mantenimiento de la esterilidad y la minimización de oclusiones de células y de burbujas.

Se desarrollaron redes microfluídicas que soportan los flujos fisiológicos y las presiones por fotoestampado de SU-8, una resina fotosensible negativa de alta relación de aspecto, sobre silicio. Esto se usó como molde para la colada de polidimetilsiloxano (PDMS). Después de retirar el molde, se extrajeron entradas y salidas con agujas de jeringa romas, y el armazón polimérico microestampado se selló irreversiblemente a una capa no estampada de Pyrex® o PDMS por tratamiento superficial con plasma de oxígeno. Véase Duffy, et al., Anal. Chem. 70, 4974 (1998). El dispositivo microfluídico se esterilizó en autoclave y se perfundió con una solución que contenía moléculas de adhesión de células (poli-L-lisina, colágeno, gelatina o fibronectina), que se dejaron adsorber durante una hora.

Entonces, la red fluidica se sembró con  $1 \times 10^6$ - $1 \times 10^8$  células/ml de suspensión de células usando una bomba de jeringa a caudales que oscilaban de 10-100  $\mu$ l/min. Entonces se dejó que las células se unieran durante 24 horas, después de lo cual el dispositivo se conectó en línea con un biorreactor estéril que consistía en una bomba peristáltica, oxigenador, trampa de burbujas y un depósito de medio de cultivo estéril. El medio de cultivo estéril se bombeó peristálticamente de un depósito estéril mediante un oxigenador que consistía a lo largo de la longitud en tubo semipermeable al oxígeno. El oxigenador fue seguido de una pequeña trampa de burbujas, que condujo directamente al circuito microfluídico. Finalmente, el sistema se ejecutó en bucle cerrado en una estufa de incubación a parámetros de cultivo estándar.

La esterilización en autoclave del circuito microfluídico no causó distorsión de patrones obvia. El recubrimiento de los canales con moléculas de adhesión de células potenció la unión de células cuando se comparó con solución salina tamponada con canales de control recubiertos con fosfato. La siembra de las células dentro de canales de anchuras entre 30-200  $\mu$ m se optimizó variando las concentraciones y caudales. El biorreactor de flujo continuo se usó para cultivar dinámicamente células endoteliales a caudales entre 0,01 ml/min y 0,1 ml/min. Tanto los canales individuales como las redes de canales complejas (30-200  $\mu$ m de ancho y 40  $\mu$ m de profundidad) se sembraron satisfactoriamente y se cultivaron. En canales individuales de 100  $\mu$ m x 40  $\mu$ m, las células se cultivaron durante más de 4 semanas sin contaminación u oclusión.

Se logró el cultivo a largo plazo de células en dispositivos microfluídicos. Las células se unieron satisfactoriamente, proliferaron y migraron en canales microfabricados cerrados con geometrías pequeñas.

#### Ejemplo 4

Generación de tejido hepático tridimensional funcionalmente diferenciado a partir de hojas bidimensionales de hepatocitos pequeños y células no del parénquima

En este ejemplo, se fabricó tejido de hígado vascularizado tridimensional *in vivo* a partir de una monocapa no vascularizada u hoja de células de hepatocitos pequeños (SHC) formada sobre una oblea de silicio. Las células SHC son más pequeñas que los hepatocitos maduros (MHC), pero morfológicamente similares, con una capacidad muy proliferativa (Mitaka, et al., Biochem Biophys Res Commun 214, 310 (1995); Mitaka, et al., Gastroenterol Hepatol 13 Suppl, S70 (1998); Mitaka, et al., Hepatology 29, 111 (1999); Tateno, et al., Am J Pathol 148, 383 (1996); Tateno, et al., Am J Pathol 149, 1593 (1996)).

Se implantaron hojas de células creadas a partir de SHC y NPC sobre epiplón de rata con estimulación hepatotrófica máxima por retrorsina, derivación portocava y hepatectomía parcial, y se evaluaron su injerto y función. Usando este tipo de célula, co-cultivadas con células no del parénquima (NPC), el tejido del hígado que mantuvo un alto nivel de producción de albúmina se fabricó en un sistema de cultivo de flujo. Los animales como se describen en Ejemplo 1 se usaron como donantes de células. Las células se cultivaron como se describe en la sección de medio de cultivo de hepatocitos del Ejemplo 1.

#### Aislamiento de células

Se aislaron SHC y NPC por el proceso descrito en el Ejemplo 1, con las modificaciones siguientes. Los animales se anestesiaron por una inyección intramuscular con ketamina y xilazina. Las células se recogieron, se suspendieron, se filtraron y se centrifugaron como se ha descrito previamente. Tras la centrifugación, se desechó el sedimento que

contenía la mayoría de MHC. El sobrenadante se recogió, y la fracción que contenía SHC y NPC se obtuvo como un sedimento mediante centrifugación adicional dos veces a 150 x g durante 5 minutos. El sedimento se resuspendió en el medio de chapado y se contaron el número de células y la viabilidad usando la prueba de exclusión con azul de tripano.

5

#### *Reparación de hojas de SHC in vitro*

Con el fin de obtener hojas de SHC, se sembraron SHC y NPC y se cultivaron sobre obleas de silicio (10 cm de diámetro). Brevemente, las obleas de silicio se esterilizaron con gas óxido de etileno y se recubrieron con colágeno líquido (Vitrogen 100, Collagen Corp., Palo Alto, CA). Se resuspendió la mezcla de SHC y NPC en el medio de chapado a una densidad de  $0,8 \times 10^5$  células/ml. Se sembraron 25 ml de suspensión sobre la oblea de silicio en una placa de Petri de 15 cm y se incubaron a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>. El medio de chapado se cambió cada dos días. Después de llegar a confluencia, las células cultivadas se levantaron como hoja por raspado con una hoja de cuchilla estéril y se prepararon para la implantación.

15

#### *Producción de albúmina*

Para evaluar la función de SHC antes de la implantación, la concentración de albúmina en el medio de chapado se midió 3, 5, 7 y 10 días después de la siembra de las células usando un ensayo de inmunoadsorción (ELISA) (n = 11) como se describe en el Ejemplo 1.

20

#### *Modelo in vivo*

Se administró retrorsina dentro de la cavidad peritoneal de ratas receptoras (n = 23) a una dosis de 3 mg/ml/100 g en el día 0, y después de dos semanas como se ha informado previamente (Laconi, et al., Am J. Pathol 153, 319 (1998)). Tres semanas después de la segunda administración, se creó una derivación portocava de extremo a lado usando sutura 8-0 Ethilon (ETHICON, Somerville, NJ) para generar estimulación hepatotrófica sistémica para la implementación de la hoja de SHC. Una semana después, se extendió una hoja de SHC sobre el epiplón de la rata y se enrolló de distal a proximal en un cilindro tridimensional. El epiplón se suturó a la pared anterior del estómago usando sutura 7-0 Prolene (ETHICON). Se realizó una hepatectomía parcial del 60 % simultáneamente para la estimulación hepatotrófica. Los animales se sacrificaron en los momentos de tiempo designados después de la implantación de hojas de SHC para la recuperación de especímenes. Los especímenes reseccionados se fijaron en solución al 10 % de formalina (Sigma), se procesaron rutinariamente y se incorporaron en parafina para la tinción con hematoxilina-eosina (H & E) e inmunohistoquímica posterior. Dos especímenes se fijaron en 2,5 % de glutaraldehído (Sigma) para microscopía electrónica (EM).

25

30

35

#### *Tinción inmunohistoquímica*

Para caracterizar las construcciones implantadas, se realizó tinción inmunohistoquímica usando el método del complejo de avidina-biotina-peroxidasa (ABC). Los anticuerpos primarios incluyeron: anti-albúmina de conejo (DAKO, Carpinteria, CA), anti-transferrina de conejo (ICN), anti-pancitoqueratina de ratón (Sigma), anti- $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa de cabra (GTT) (una donación del Dr. Petersen, Departamento de Patología, Universidad de Florida, FL). Se desparafinaron secciones de cuatro  $\mu$ m de parafina y se trataron con 4,5 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en metanol. Los especímenes se digirieron durante 12 minutos con solución al 0,1 % de tripsina, seguido de tratamiento con avidina D (Vector) y 5 % de suero. Posteriormente, los portaobjetos se incubaron con el anticuerpo primario respectivo que se diluyó en solución salina tamponada con fosfato con 1 % de albúmina de suero bovino durante la noche a 4 °C. Se usó anticuerpo biotinilado anti-ratón/conejo/cabra como anticuerpo secundario en combinación con el kit Vectastain ABC (Vector, Burlingame, CA). Finalmente, los especímenes se trataron con 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) (Vector) como sustrato y se contratiñeron con solución de hematoxilina de Mayer (Sigma).

45

50

#### *Microscopía electrónica (EM)*

Se sacrificaron dos ratas a los 4 meses para el estudio de EM. Inmediatamente después de extirpar el animal, secciones de 1 mm se dispusieron dentro de solución KII de Karnovsky (2,5 % de glutaraldehído, 2,0 % de paraformaldehído, 0,025 % de cloruro de calcio, en un tapón 0,1 M de cacodilato sódico, pH 7,4), se fijaron durante la noche a 4 °C, y se procesaron rutinariamente para EM. Se eligieron áreas representativas de secciones de 1  $\mu$ m teñidas con azul de toluidina. Las secciones se examinaron usando un microscopio electrónico de transmisión Phillips 301.

55

60

#### *Análisis morfológico y cuantitativo*

Para el análisis morfológico y cuantitativo, se recogieron especímenes a las 2 semanas (n = 7), 1 mes (n = 7) y 2 meses (n = 7). En cada momento de tiempo, el epiplón enrollado se cortó perpendicularmente a la curvatura mayor de estómago, y se obtuvieron de tres a cuatro secciones transversales de tejido y se tiñeron con H & E. El área ocupada por las construcciones implantadas en cada sección se midió usando análisis asistido por ordenador con el

65

software NIH Imagen versión 1.61 (División de Investigación Informática y Tecnología, NIH, Bethesda, Maryland, EE.UU.). Esto se expresó como  $\mu\text{m}^2/\text{sección}$ .

*Análisis estadístico*

5 Todos los valores se expresan como media  $\pm$  DE y se evaluaron estadísticamente usando la prueba de Mann-Whitney o la prueba de la t de datos emparejados. Un valor de  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

*Aislamiento de células y crecimiento en un matraz de cultivo*

10 Todos los aislamientos de células dieron  $8-14 \times 10^7$  células que comprenden SHC y NPC con  $>90\%$  de viabilidad global. Para evaluar la condición de cultivo de SHC sobre obleas de silicio, se sembró una suspensión de células en matraces de cultivo a la misma concentración. Un día después de la siembra, la mayoría de las células empezaron a unirse individualmente u ocasionalmente formando pequeñas agrupaciones que consistían en varias SHC. Después de 3 días, las células se habían unido completamente y se extendieron sobre el matraz de cultivo. Después de 5 días, se habían formado muchas agrupaciones y se observaron NPC entre las agrupaciones. Estas agrupaciones pequeñas se unieron para formar agrupaciones más grandes y continuaron creciendo hasta la implantación (Figura 17).

*Formación de hojas de células*

20 SHC y NPC cultivadas en obleas de silicio crecieron similarmente al matraz de cultivo. Se observaron muchas agrupaciones grandes macroscópicamente sobre las obleas de silicio después de cultivar durante 10-14 días. Las células cultivadas se levantaron como una hoja de todas las obleas de silicio. Después de levantarse, las hojas de células se encogieron a aproximadamente 2,5 cm de diámetro (Figura 18)

*Producción de albúmina*

30 La secreción de albúmina en el día 3, 5, 7 y 10 fue  $6,47 \pm 2,49$ ,  $12,08 \pm 5,18$ ,  $19,93 \pm 4,05$ ,  $30,14 \pm 5,46$  ( $\mu\text{g}/\text{día}$ ), respectivamente (Figura 19). Hubo una diferencia estadísticamente significativas entre el día 3 y el día 5, el día 5 y el día 7, y el día 7 y el día 10 ( $p < 0,05$  por la prueba de la t de datos emparejados).

*Tinción de H & E*

35 La tinción de H & E de especímenes recogidos a las 2 semanas después de la implantación de hojas de células normalmente revela células eosinófilas poligonales grandes con núcleos redondos que se parecen a hepatocitos, células cuboidales que se parecen a células epiteliales biliares, y formación de capilares. En este momento, el área de los hepatocitos era inferior a capas de cinco células de espesor (Figura 20A). A los 1 y 2 meses podrían observarse agrupaciones grandes de hepatocitos de capas de más de cinco células de espesor, células cuboidales que se parecen a células epiteliales biliares y formación de capilares (Figura 20B-D). En algunas áreas, los hepatocitos superaron la capa de diez células de espesor. En los especímenes a las 2 semanas y 1 mes, hubo muchas áreas que estuvieron principalmente ocupadas por estructuras similares a los conductos biliares (Figura 20D). A medida que el implante maduró en el epiplón, aumentó el número de hepatocitos y disminuyó el número de estructuras similares a conductos biliares a los 2 meses.

*Inmunohistoquímica*

50 Tanto los hepatocitos como las estructuras similares a los conductos biliares se tiñeron positivamente con pancitoqueratina. Sin embargo, los conductillos biliares se tiñeron más fuertemente que los hepatocitos (Figura 21A). Como normalmente no hay células pan-citoqueratina positivas en el epiplón, es probable que las células se originaran a partir de las construcciones implantadas. Algunos de los hepatocitos se tiñeron positivamente para albúmina y transferrina, que sugiere que continuaron expresando las funciones específicas del hígado específica. Las estructuras similares a los conductos biliares se tiñeron positivamente para GGT, una enzima expresada a altos niveles en células epiteliales biliares intrahepáticas de rata normales, pero normalmente no se detectaron en hepatocitos de rata normales, y negativamente para albúmina y transferrina, que indicó que estuvieron compuestas de células que se parecen a células epiteliales biliares normales (Figura 21B-D).

60 En un caso, la histología mostró que una estructura similar a los conductos biliares a las 2 semanas se formó con tanto células que se parecen a las células epiteliales biliares como células que fueron morfológicamente más similares a los hepatocitos (Figura 22). Esta estructura similar a los conductos se localizó entre las estructuras similares a los canalículos compuestas de hepatocitos, y las estructuras similares a los conductos formadas únicamente por células que se parecen a las epiteliales biliares como si fuera una estructura transicional entre las dos. Este fenómeno demuestra que las estructuras similares a los canalículos y las estructuras similares a los conductos biliares crecen hasta la confluencia en construcciones manipuladas por ingeniería de tejido.

65

### *Ultraestructura de la construcción implantada*

La TEM reveló que las construcciones manipuladas por ingeniería estuvieron compuestas de células con grandes núcleos redondos, numerosas mitocondrias y peroxisomas, y microvellosidades; característicos de hepatocitos. Estas células formaron estructuras que se parecen a los canalículos biliares en las fronteras célula-célula. Se observaron capilares entre los hepatocitos (Figura 23B).

### *Análisis morfológicos y cuantitativos*

Las áreas calculadas que ocupaban las construcciones implantadas fueron  $43136 \pm 36181$ ,  $153810 \pm 106422$ , y  $224332 \pm 142143 \mu\text{m}^2/\text{sección}$  a las 2 semanas, 1 mes y 2 meses, respectivamente. El área media aumentó con el tiempo, y hubo diferencias significativas entre 2 s y 1 m ( $p < 0,05$ ), y entre 2 s y 2 m ( $p < 0,01$ ). No se observó diferencia significativa entre 1 m y 2 m. Las áreas ocupadas por estructuras similares a los conductores biliares fueron  $13407 \pm 16984$ ,  $15430 \pm 8980$  y  $1290 \pm 2052 \mu\text{m}^2/\text{sección}$  a las 2 semanas, 1 mes y 2 meses, respectivamente. Las áreas fueron significativamente mayores a las 2 semanas ( $p < 0,01$ ) y 1 mes ( $p < 0,05$  por la prueba de la U de Mann-Whitney), en comparación con el área a los 2 meses (Figura 24).

Este ejemplo muestra morfológicamente hojas de células simples creadas a partir de SHC y NPC implantadas e injertadas en el epiplón. Dada la estimulación hepatotrófica adecuada, los implantes formaron tejido tridimensional morfológicamente complejo que consiste en hepatocitos, estructuras que se parecen a canalículos biliares y conductos compuestos de células que se parecen a epitelio biliar. Estos resultados representan un avance significativo hacia la ingeniería de tejidos de tejidos gruesos vascularizados complejos.

### *Ejemplo 5*

#### *Generación de un dispositivo de sustitución renal*

Este ejemplo describe una red microfabricada de túbulos proximales que podría posiblemente sustituir las funciones reabsorptivas y excretoras esenciales del riñón (véanse las Figuras 25-28). Una red revestida de células endoteliales glomerulares puede proporcionar filtración, mientras que minimiza la trombosis. Estas dos redes combinadas sobre polímero biorresorbible son la base de un dispositivo de sustitución renal diseñado por ingeniería tisular.

#### *Antecedentes*

Aunque el riñón es un órgano complejo con un suministro vascular intrincado y al menos 15 tipos diferentes de células, las funciones críticas de la filtración, reabsorción y excreción, pueden seleccionarse como diana con la ingeniería tisular. La unidad funcional básica del riñón, la nefrona, está compuesta por un filtro vascular, el glomérulo, y una unidad resortiva, el túbulo. La filtración depende del flujo y las células endoteliales glomerulares especializadas. La mayoría (50-65 %) de la reabsorción se realiza por las células de túbulos proximales usando transporte de sodio activo mediante la  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$  dependiente de energía localizada en la membrana basolateral. Se requiere solo el 5-10 % del aproximadamente un millón de nefronas en cada riñón humano para mantener la función excretora normal.

El diseño de un dispositivo de sustitución renal diseñado por ingeniería tisular puede por tanto centrarse en el desarrollo de un filtro endotelial glomerular conjuntamente con un dispositivo de túbulos proximales para la reabsorción y excreción. El filtro endotelial está específicamente diseñado para proporcionar flujo fisiológico con baja trombogenicidad y área superficial maximizada para el transporte de soluto. El dispositivo de túbulos proximales, que contiene un número apropiado de células para la sustitución renal, tiene área superficial optimizada para la reabsorción de soluto y una salida para la excreción de orina (véase la Figura 27). Pueden apilarse varias capas de moldes y/o armazones poliméricos y membranas semi-permeables para optimizar la filtración y reabsorción (Figura 28). Se usan polímeros biocompatibles, biorresorbibles y microporosos en todas partes para el crecimiento y la función celular óptimos.

#### *Materiales y métodos*

##### *Configuración del molde*

Se usó moldeo de réplicas por MEMS para crear los moldes de polímero usados en este ejemplo (Figura 2). Usando las técnicas descritas en el presente documento, se formó un patrón inverso (es decir, protuberancias en vez de hendiduras) correspondientes al patrón deseado de microcanales sobre una oblea de silicio. Entonces se coló poli(dimetilsiloxano) (PDMS) sobre la plantilla de silicio. Después de eliminar la plantilla, el PDMS se sometió a tratamiento por plasma de  $\text{O}_2$ , y se fijó a una segunda capa de PDMS. En este ejemplo, la segunda capa de PDMS era plana, sin embargo, en otras realizaciones, cualquiera o las dos superficies de la segunda capa de PDMS pueden contener un patrón de microcanales. Además, una membrana semi-permeable puede fijarse entre las capas de PDMS.

*Cultivo celular*

Se han aislado células de túbulo proximales renales y células endoteliales glomerulares de modelos de rata y de cerdo usando filtración en tamiz y separación sobre un gradiente de Percoll (Vinay, et al. Am J Physiol 241, F403 (1981); Misra, et al. Am J Clin Path 58, 135 (1972)). Se aislaron células endoteliales microvasculares humanas de prepucio neonatal normal en colaboración con el Dr. Michael Detmar (Centro de Investigación de Biología Cutánea, MGH Charlestown), y se tiñeron positivamente para los marcadores de células endoteliales CD-31 y factor de von Willebrand (vWF) dentro de los dispositivos de PDMS.

Tanto las células de túbulo proximales renales como las células endoteliales microvasculares humanas se sembraron dentro de los dispositivos de PDEM (poli(dimetilsiloxano)) diseñados para MEMS a 20 millones de células/ml. Se dejó que las células se adhirieran a 37 °C durante seis horas. Los dispositivos se giraron 180 grados a las tres horas para permitir la adherencia de células a ambos lados de los microcanales. Entonces, el flujo se inició mediante la bomba de infusión con medio de cultivo apropiado para mantener la viabilidad celular.

*Modelo animal*

El animal apropiado se hace urémico mediante nefrectomías bilaterales y se conecta a un circuito de hemoperfusión. El dispositivo de sustitución renal diseñado por ingeniería tisular se conecta de tal manera que la sangre venosa entre en la red endotelial glomerular y se devuelva al animal. El fluido filtrado a través de la red glomerular pasa entonces a través de la red de túbulo proximales. El fluido reabsorbido se devuelve al animal, mientras que el fluido que queda en la luz del tubo proximal se analiza como ultrafiltrado procesado (orina). La tasa objetivo de hemofiltración es 15-20 ml/min para coincidir con la tasa usada en la diálisis renal. La función del dispositivo de sustitución renal se evalúa en comparación con los controles de correspondencia para electrolitos, nitrógeno ureico en sangre y niveles de creatinina, reabsorción de glutatión, excreción de amoníaco y niveles de 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>.

Resultados

Se sembraron células endoteliales microvasculares humanas dentro de microcanales de poli(dimetilsiloxano) (PDMS) (anchura de canal más pequeña 30 μm, profundidad 35 μm) usando las plantillas de MEMS específicamente diseñadas, y se observó la buena adherencia a células y proliferación dentro de los canales (Figura 29).

Se usa un modelo computacional para maximizar la circulación sanguínea a través del filtro de células glomerulares, dentro de parámetros hemodinámicos normales. Se usan tecnologías de modelado de elementos finitos (FEM) para maximizar el área superficial para la filtración para simular el transporte de masa de solutos a través del filtro. La topografía de la plantilla y los ángulos de ramificación se diseñan para minimizar la trombosis dentro de los microcanales. Similarmente, la red de túbulo proximales se optimiza para proporcionar distribución de flujo uniforme, área superficial para la reabsorción y un tracto de flujo de salida para la excreción de orina.

Las células de túbulo proximales cultivadas presentan formación de domos características. También se han aislado y mantenido en cultivo células endoteliales glomerulares. Se realiza caracterización adicional de las células usando tinción inmunohistoquímica. Las células de túbulo proximales se tiñen para expresión de megalina (gp330), y las células endoteliales se tiñen para factor de von Willebrand (vWF) y CD-31.

La función de células de túbulo proximales se evalúa con la conversión de 1,25-OH-D<sub>3</sub> en 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-(1,25-dihidroxivitamina D<sub>3</sub>), la recuperación de glutatión y la generación de amonio usando un sistema de perfusión de paso único. La 25-(OH) D<sub>3</sub>-12-hidroxilasa es una citocromo P-450 monooxigenasa encontrada en la membrana mitocondrial interna de células de los túbulo proximales. La recuperación de glutatión de túbulo proximales se realiza por la enzima de borde en cepillo gamma-glutamyl transpeptidasa. Además, también se prueban las funciones de transporte específico tales como el transporte de fluidos vectorial (inhibido por ouabaína, un inhibidor de Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPasa), transporte de bicarbonato activo y glucosa (inhibido por acetazolamida y florzina, respectivamente) y la secreción de para-aminohipurato (inhibida por probenecid) (Humes, et al., Kid Int 55,2502 (1999); Humes, et al. Nat Biotechnol 17, 451 (1999)). Se evalúa la función de células endoteliales glomerulares para la permeabilidad al agua y proteínas del suero, y se analizan los componentes de la membrana basal.

Se han sembrado satisfactoriamente células endoteliales microvasculares y de túbulo proximales en redes de PDMS hechas de plantillas de MEMS. Las Figuras 30-32 muestran células de túbulo proximales que crecen en los microcanales del armazón polimérico a diversos intervalos después de la siembra.

Después de la generación de moldes de polímero biodegradable microporoso, la unión y proliferación de células específicas se prueban usando ensayos de ADN o MTT. Las células sobre los moldes de polímero se examinan para la confluencia usando histología y microscopía electrónica, además de las tasas de fuga de insulina (<10 % de la infundida). La unión potenciada de células de los túbulo proximales y endoteliales glomerulares a polímeros se optimiza por recubrimiento previo de la superficie del polímero con varios componentes de la matriz extracelular

(Matrigel, colágeno, fibronectina y laminina) o secuencias de péptidos tales como RGD, como se describe en el presente documento.

5 Se realizan estudios de flujo en redes endoteliales glomerulares y de túbulos proximales *in vitro* para simular la circulación sanguínea fisiológica y los parámetros hemodinámicos y para examinar la viabilidad y función celular.

10 Habiendo así descrito en detalle las realizaciones preferidas de la presente invención, debe entenderse que la invención definida por las reivindicaciones adjuntas no debe limitarse a detalles particulares expuestos en la descripción anterior, ya que son posibles muchas variaciones evidentes de los mismos sin apartarse del alcance de la presente invención. Las modificaciones y variaciones del método y aparatos descritos en el presente documento serán obvias para aquellos expertos en la materia, y pretenden estar englobadas por las siguientes reivindicaciones.

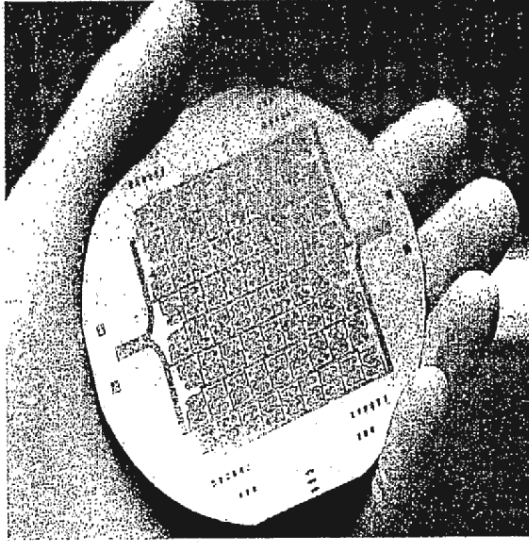
## REIVINDICACIONES

1. Un aparato de preparación de láminas de tejido en el que el aparato comprende múltiples capas de láminas de tejido apiladas y unidas entre sí, en el que cada capa de lámina de tejido comprende un primer almacén polimérico, una membrana semi-permeable y un segundo almacén polimérico, en el que la membrana semi-permeable está dispuesta entre el primer y segundo almacenes poliméricos, en el que el primer y segundo almacenes poliméricos tienen medios que definen microcanales posicionados hacia la membrana semi-permeable, en el que el primer y segundo almacenes poliméricos están unidos entre sí, y en el que cada uno del primer y segundo almacenes poliméricos y la membrana semi-permeable comprenden material que es adecuado para la unión y el cultivo de células de animales, en el que en cada uno del primer y segundo almacenes poliméricos hay un patrón de microcanales, y el patrón de microcanales en el primer almacén polimérico es adecuado para el cultivo de células endoteliales y el patrón de microcanales en el segundo almacén polimérico es adecuado para el cultivo de células del parénquima, y en el que la membrana semi-permeable permite el intercambio de gas, la difusión de nutrientes y la eliminación de residuos.
2. Un método de preparación de láminas de tejido que comprende las etapas de:
- (a) posicionar una membrana semi-permeable entre un primer y segundo almacenes poliméricos, en el que el primer y segundo almacenes poliméricos tienen medios que definen microcanales posicionados hacia la membrana semi-permeable, y en el que cada uno del primer y segundo almacenes poliméricos y la membrana semi-permeable comprenden material que es adecuado para la unión y el cultivo de células de animales;
- (b) unir entre sí el primer y segundo almacenes poliméricos, de tal manera que la membrana semi-permeable esté dispuesta entre los almacenes poliméricos, formando así un aparato; y
- (c) cultivar células en los microcanales de los almacenes poliméricos
- en el que la etapa (c) comprende:
- (i) sembrar células endoteliales dentro de los microcanales del primer almacén polimérico;
- (ii) cultivar las células de animales de (i) en condiciones tales que formen vasos sanguíneos;
- (iii) sembrar células del parénquima dentro de los microcanales del segundo almacén polimérico; y
- (iv) cultivar las células de animales de (ii) en condiciones tales que formen tejido del parénquima,
- y en el que la membrana semi-permeable permite el intercambio de gas, la difusión de nutrientes y la eliminación de residuos.
3. El aparato de la reivindicación 1 que comprende además un recubrimiento sobre los microcanales que promueve la adhesión de células al aparato.
4. El aparato de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en el que los microcanales están conectados a partir de una o más entradas, expandiéndose en más canales, y después convergiendo de nuevo en una o más salidas.
5. El aparato de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en el que los microcanales tienen un diámetro mínimo de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 500  $\mu\text{m}$ .
6. El aparato de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en el que al menos un factor de crecimiento está ligado covalentemente a la membrana semi-permeable.
7. El aparato de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en el que la membrana semi-permeable es biodegradable.
8. El aparato de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en el que la membrana semi-permeable tiene poros de aproximadamente 0,01 y aproximadamente 20  $\mu\text{m}$ .
9. El aparato de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en el que al menos uno de los almacenes poliméricos comprende orificios de paso.
10. El aparato de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en el que el primer y segundo almacenes poliméricos están unidos por unión por disolvente, vuelven a fluir por calentamiento, por tratamiento de la superficie de los almacenes poliméricos con plasma de oxígeno, flujo de polímero en la superficie de los almacenes poliméricos, fijación mecánica de los almacenes poliméricos con elementos de fijación, o adhesión de los almacenes poliméricos con adhesivos, películas adhesivas o moldes adhesivos.
11. El aparato de la reivindicación 10 o el método de la reivindicación 10, en el que los elementos de fijación están seleccionados del grupo que consiste en barbas, pernos, tornillos, pinzas, grapas, alambres, hilo y suturas.

12. El aparato de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en el que las células del parénquima deriva de un órgano seleccionado del grupo que consiste en corazón, hígado, páncreas, intestino, cerebro, riñón, tejido reproductivo, pulmón, músculo y médula ósea.
- 5 13. El aparato o método de la reivindicación 12, en el que el órgano es hígado.
14. El aparato o método de la reivindicación 12, en el que el órgano es riñón.
- 10 15. El método de la reivindicación 2, en el que los microcanales están recubiertos de un material que promueve la adhesión de células al aparato.
16. El aparato de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en el que hay un patrón de microcanales en cada uno del primer y segundo armazones poliméricos y el patrón en el primer armazón polimérico es idéntico al patrón en el segundo armazón polimérico.
- 15 17. El aparato de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en el que hay un patrón de microcanales en cada uno del primer y segundo armazones poliméricos y el patrón en el primer armazón polimérico no es idéntico al patrón en el segundo armazón polimérico.
- 20 18. El aparato de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en el que al menos un factor de crecimiento está ligado covalentemente a al menos uno de los armazones poliméricos.
19. El aparato de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en el que el material del primer armazón polimérico es idéntico al material del segundo armazón polimérico.
- 25 20. El aparato de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en el que el material del primer armazón polimérico no es idéntico al material del segundo armazón polimérico.
- 30 21. El aparato de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en el que el material de al menos un armazón polimérico es biodegradable.
22. El aparato de la reivindicación 1, en el que células de animales están presentes entre el primer armazón polimérico y la membrana semi-permeable o entre el segundo armazón polimérico y la membrana semi-permeable.
- 35 23. El aparato de la reivindicación 1, en el que células de animales están presentes entre el primer armazón polimérico y la membrana semi-permeable y entre el segundo armazón polimérico y la membrana semi-permeable.
24. El aparato de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en el que las células del parénquima derivan de células madre.
- 40 25. El aparato de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en el que el primer armazón polimérico comprende un material seleccionado del grupo que consiste en poli(dimetilsiloxano), poli(sebacato de glicerol), polilactida-co-glicolida, y combinaciones de los mismos.
- 45 26. El aparato de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en el que el segundo armazón polimérico comprende un material seleccionado del grupo que consiste en poli(dimetilsiloxano), poli(sebacato de glicerol), polilactida-co-glicolida, y combinaciones de los mismos.



**FIG. 1A**



**FIG. 1B**



Moldeo de réplicas por MEMS

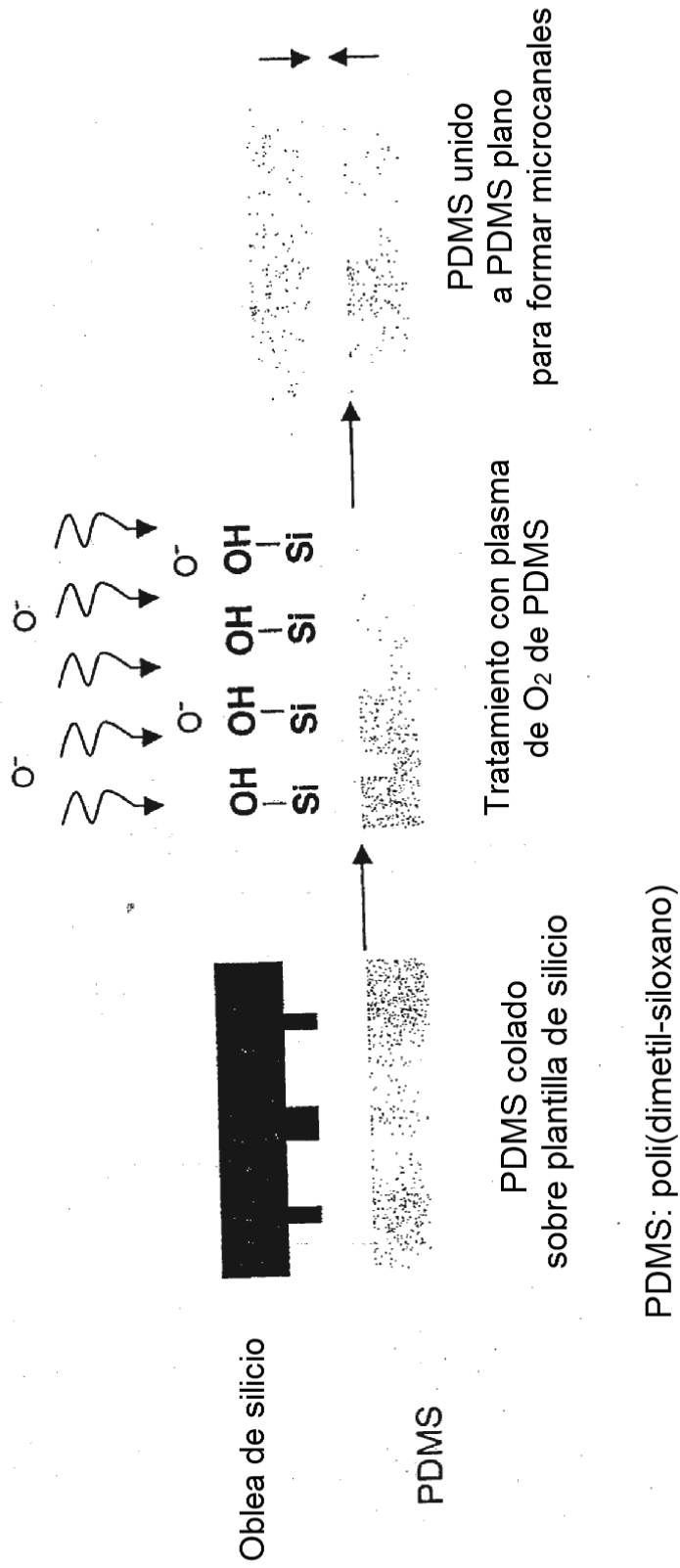


FIG. 2

**FIG. 3**



1. Oblea de silicio de partida



2. Estampar resina fotosensible



3. Grabar con plasma isotrópico el silicio



4. Eliminar la resina fotosensible

FIG. 4

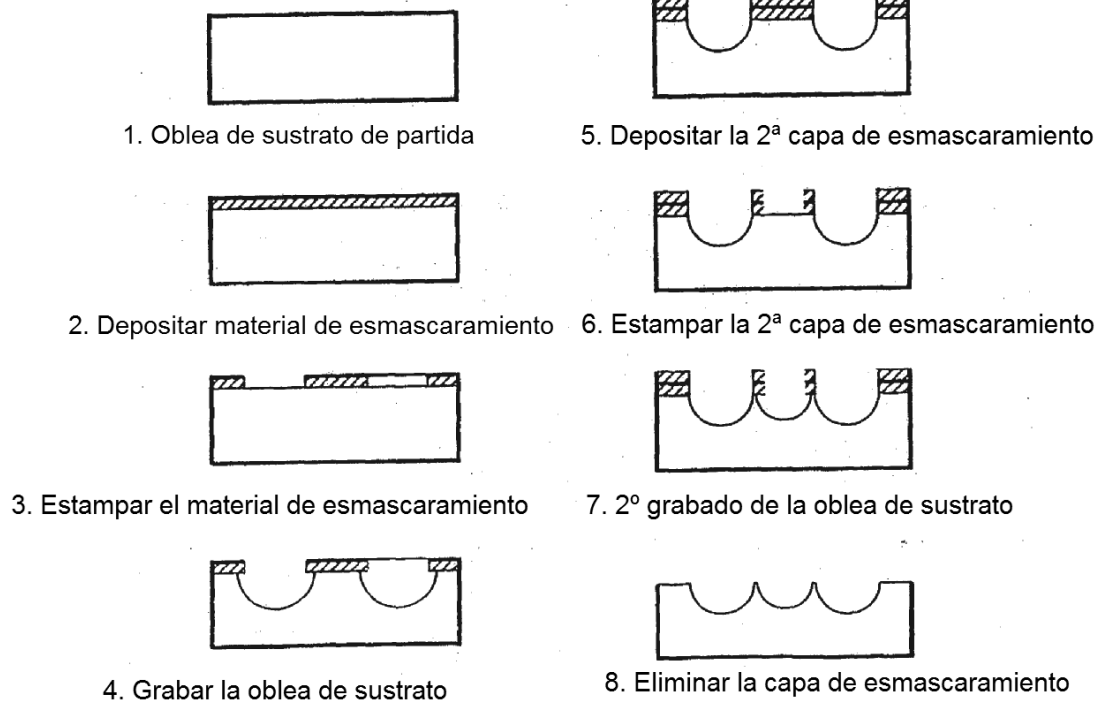


FIG. 5



FIG. 6

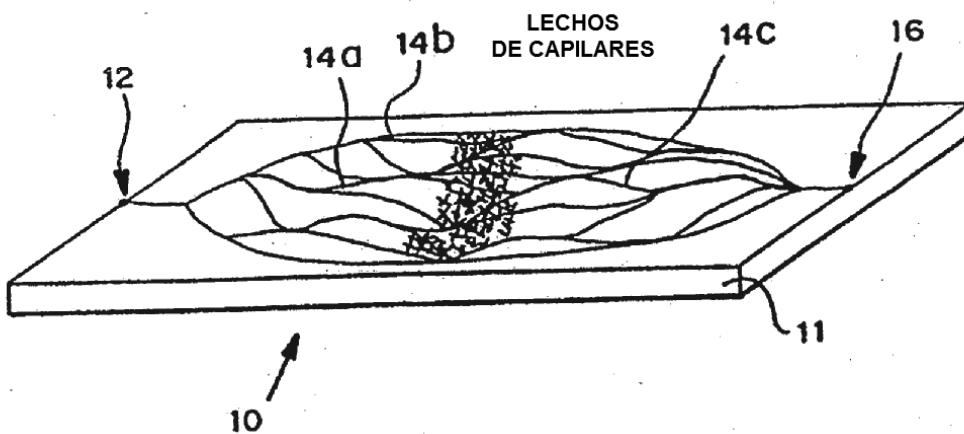


FIG. 7A

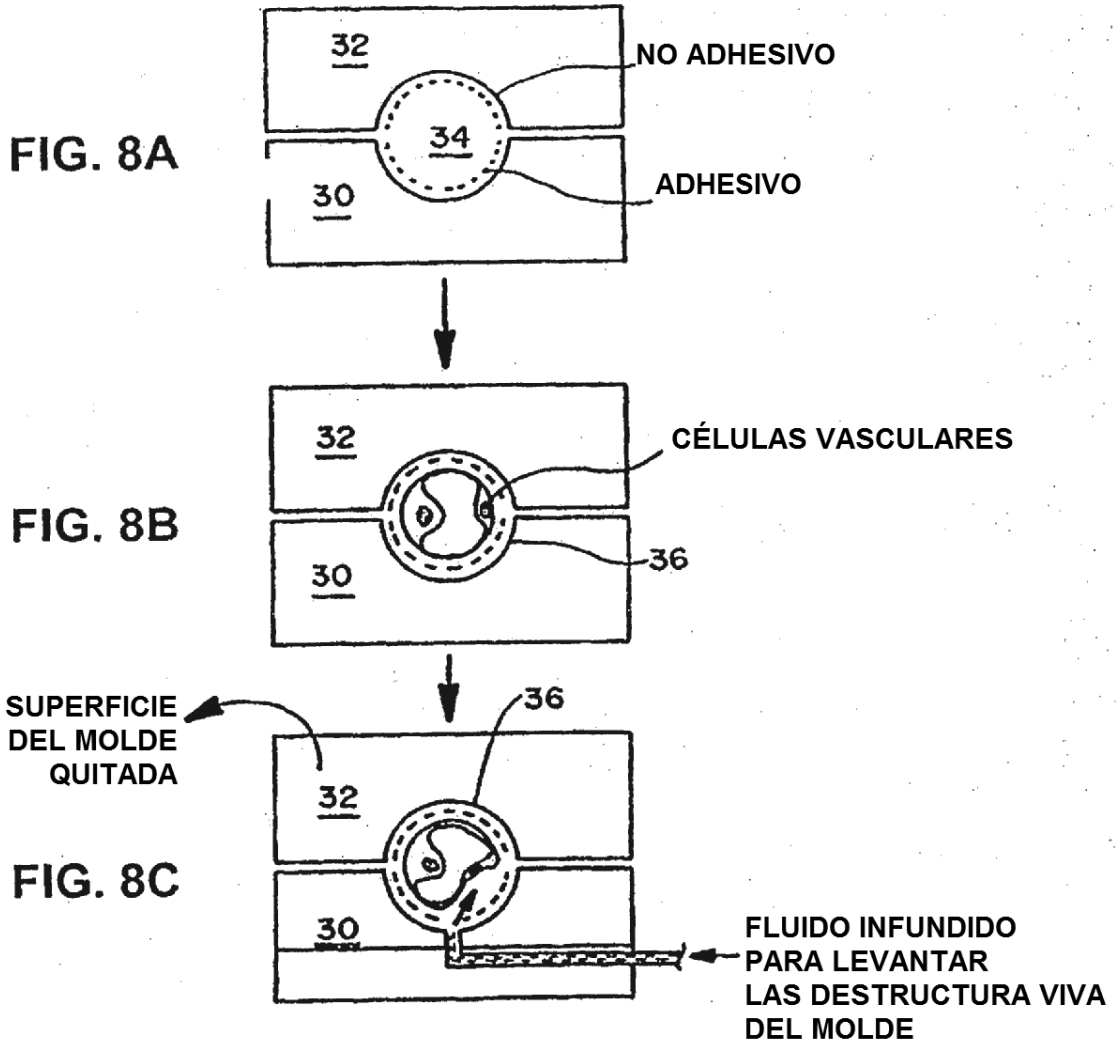


FIG. 7B



FIG. 7C

PROFUNDIDAD  
=   
5 MICRÓMETROS



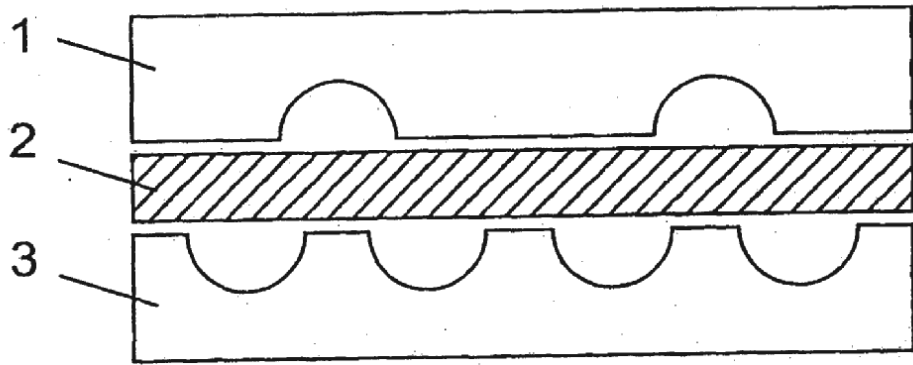


FIG. 9A

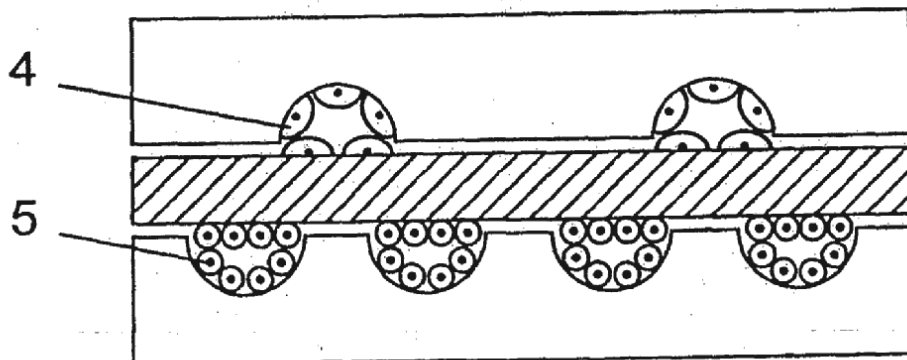


FIG. 9B

Formación de membrana (TIPS)

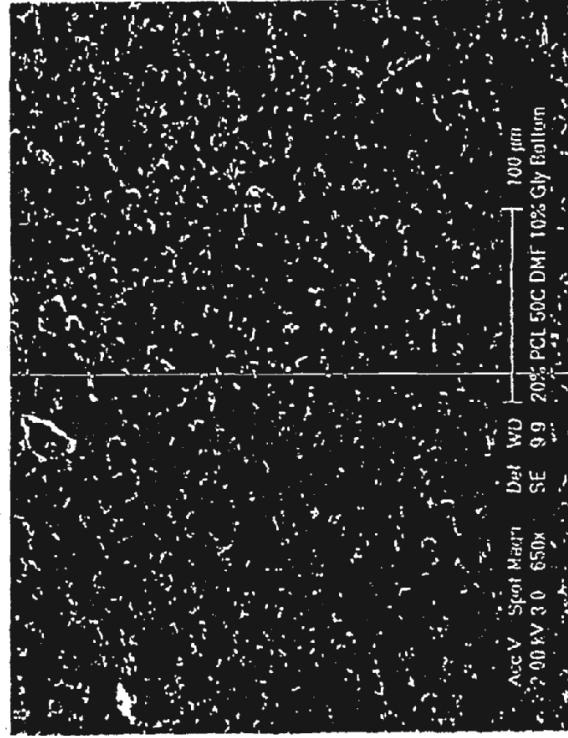
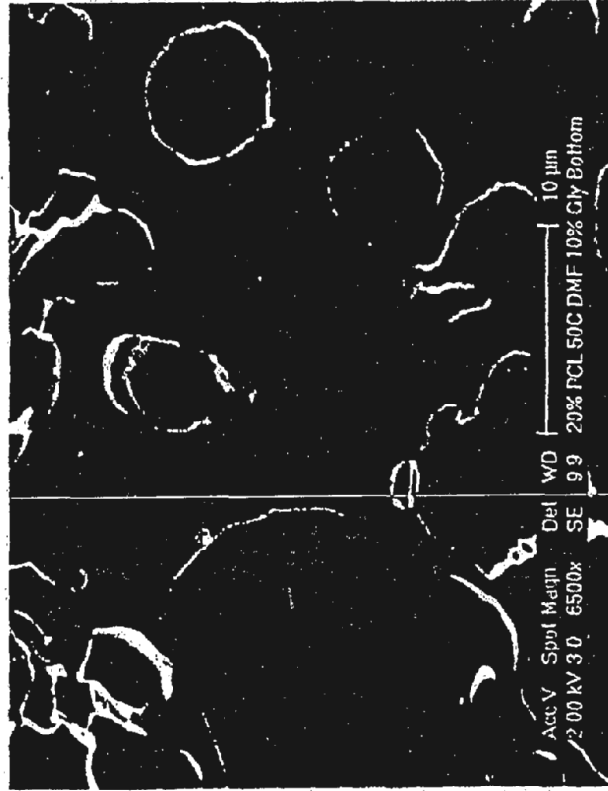


FIG. 10A





**FIG. 10B**

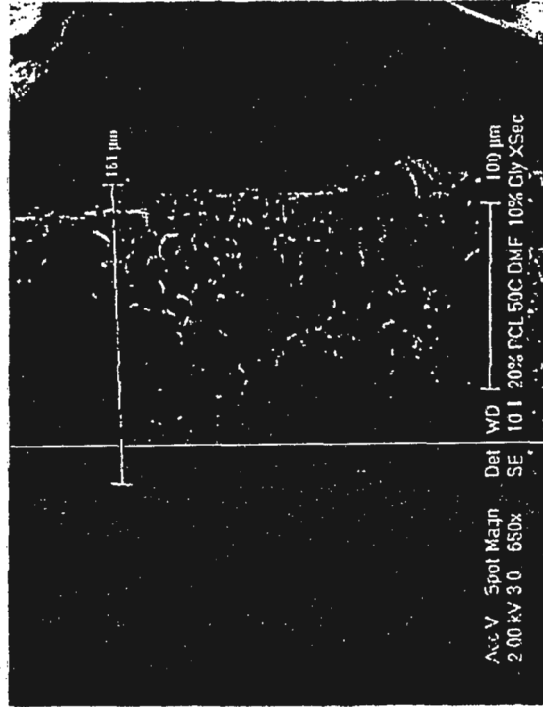
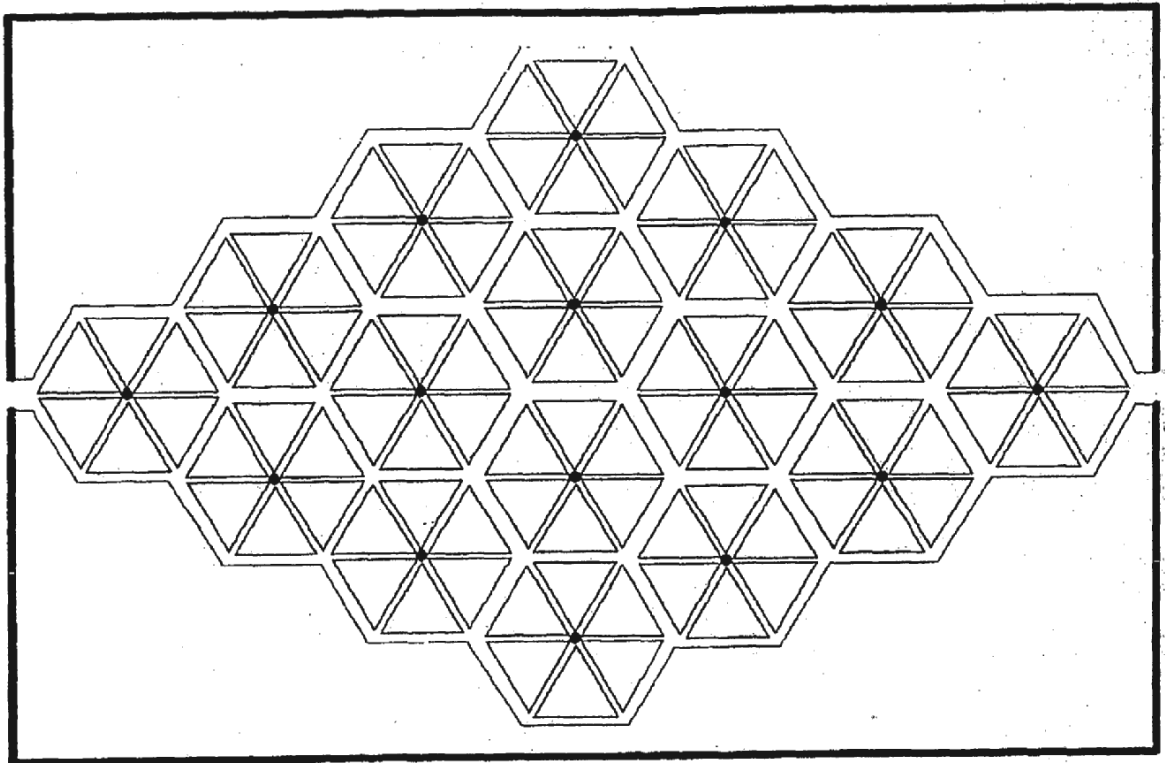
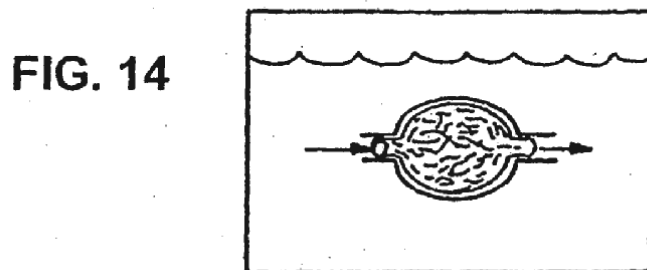
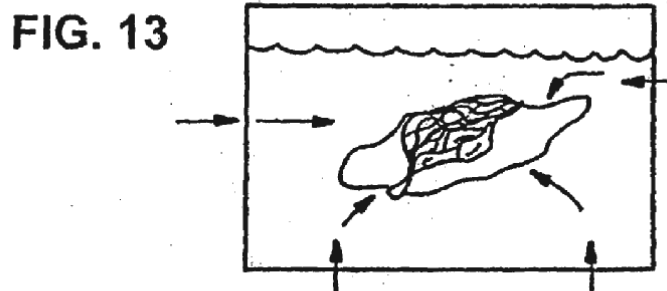
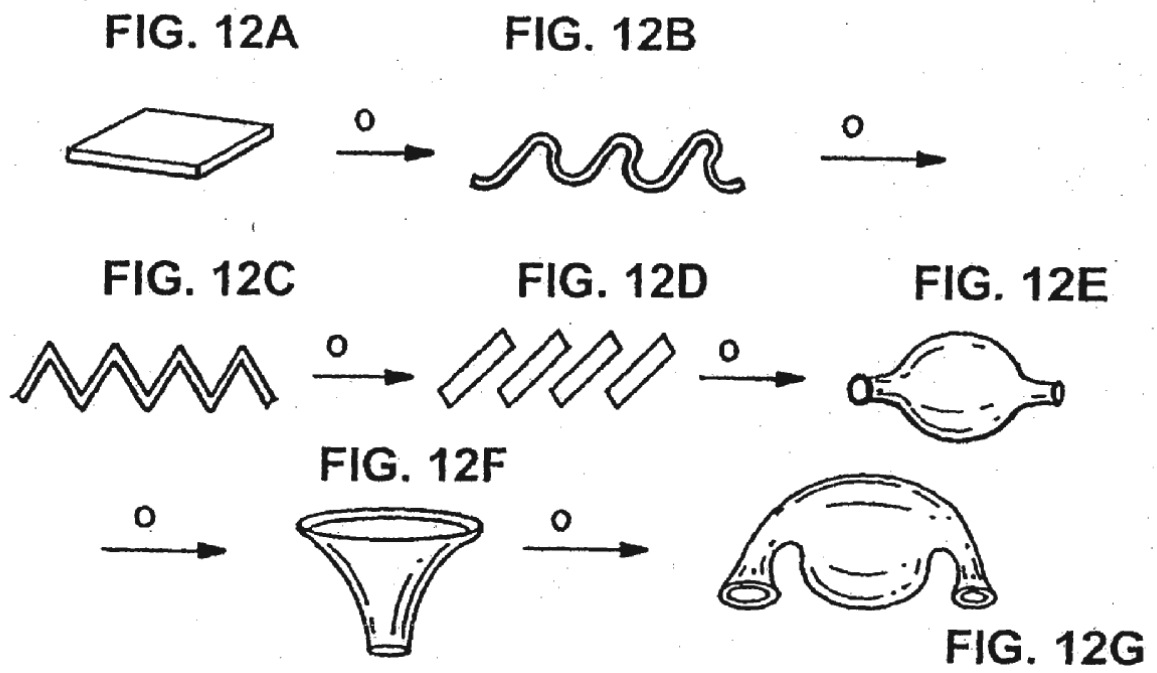


FIG. 10C



**FIG. 11**



Producción de albúmina durante 24 h

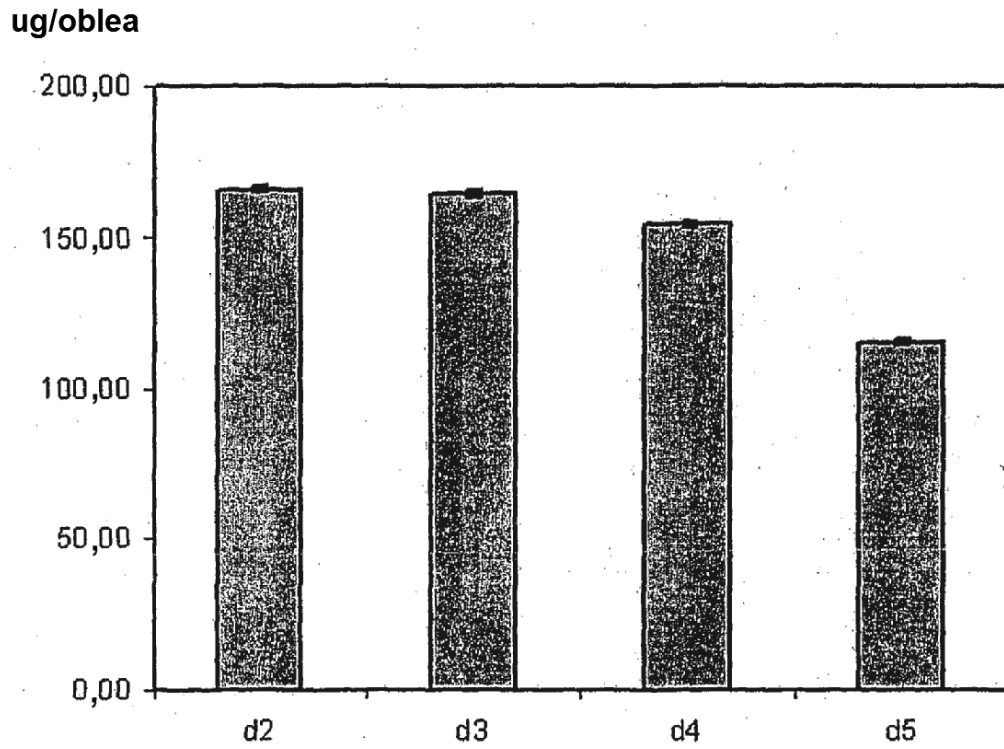
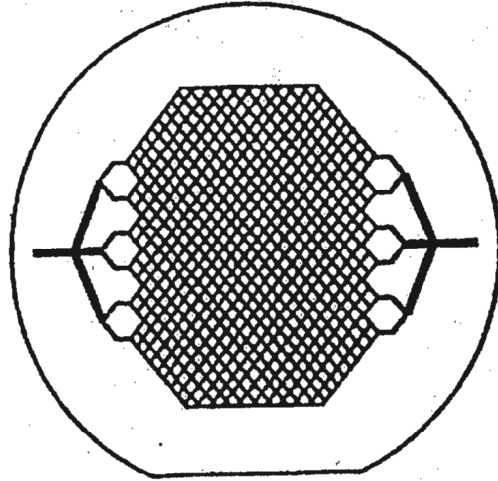
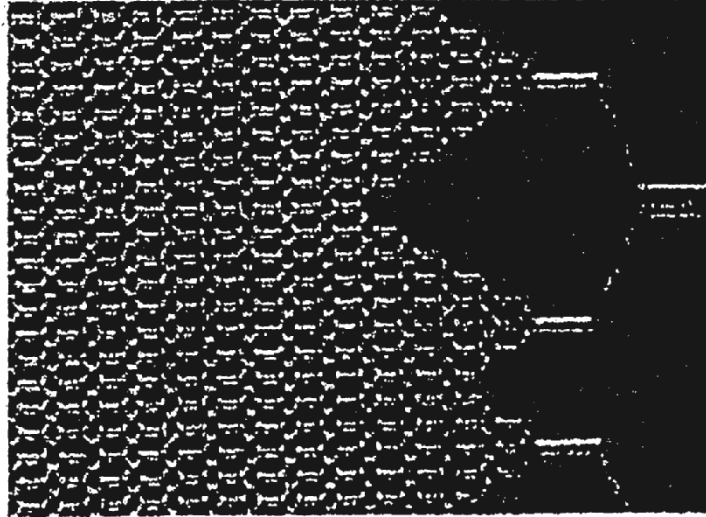


FIG. 15  
PRODUCCIÓN DE ALBÚMINA

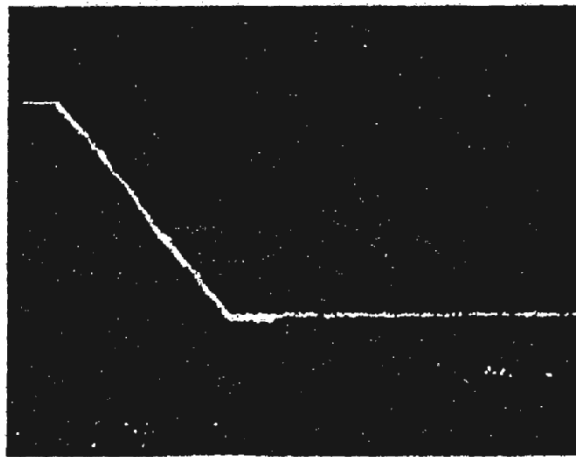
**FIG. 16A**



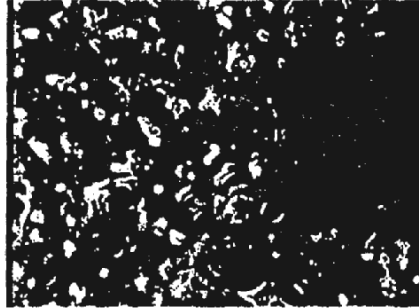
**FIG. 16B**



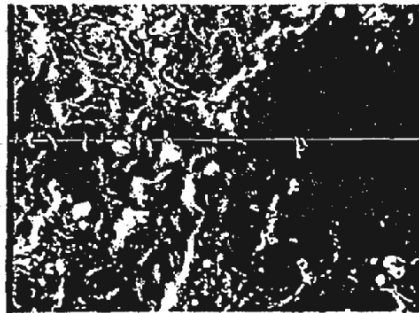
**FIG. 16C**



**FIG. 17A**



**FIG. 17B**

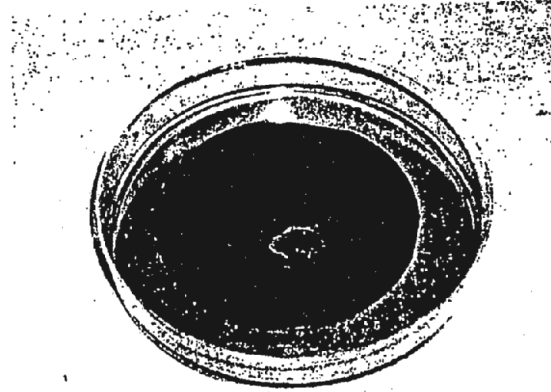


**FIG. 17C**

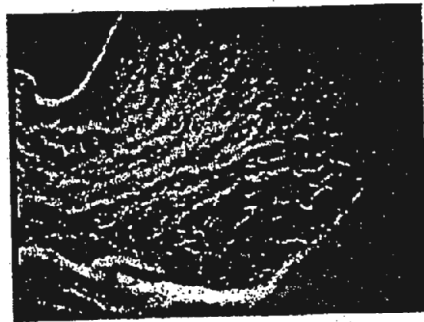




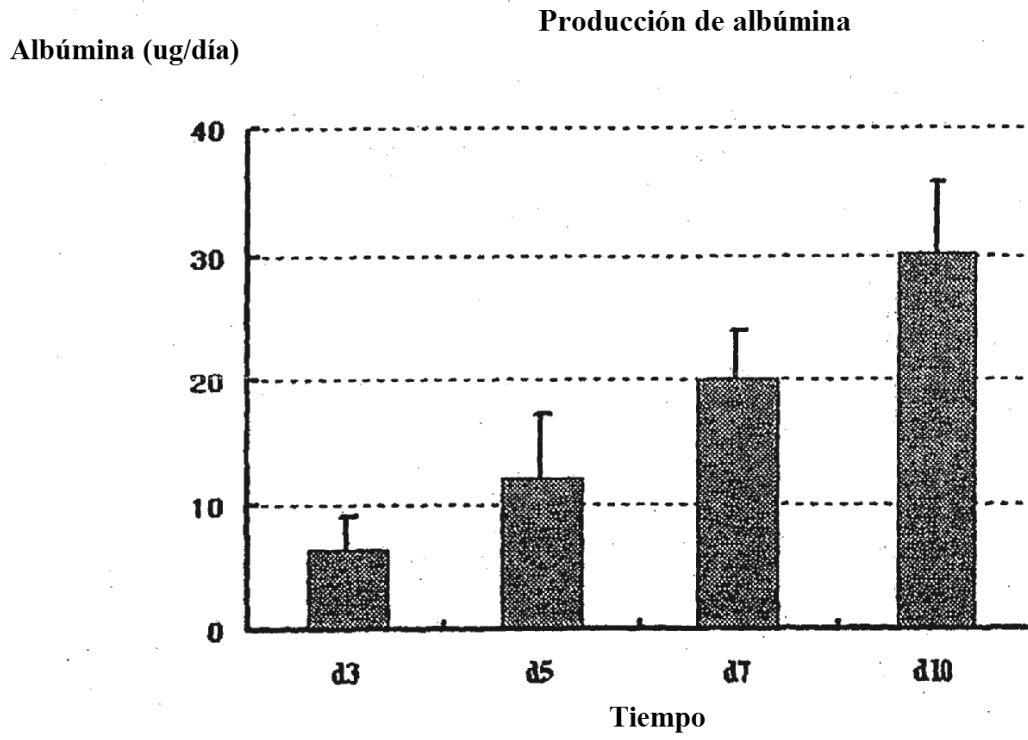
**FIG. 18A**



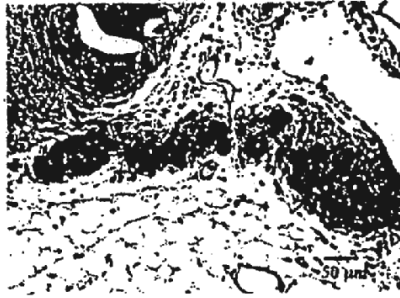
**FIG. 18B**



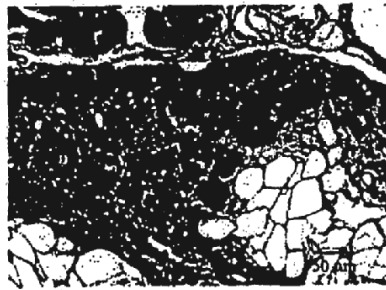
**FIG. 19**



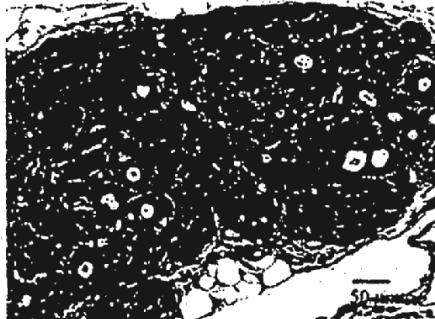
**FIG. 20A**



**FIG. 20B**



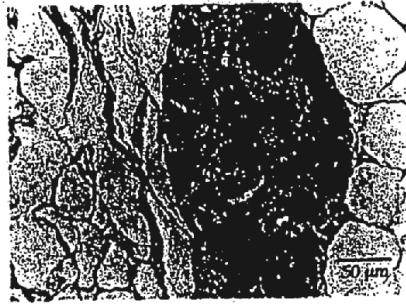
**FIG. 20C**



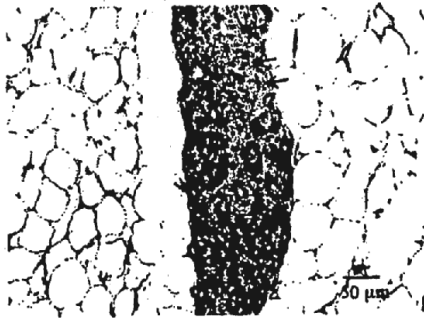
**FIG. 20D**



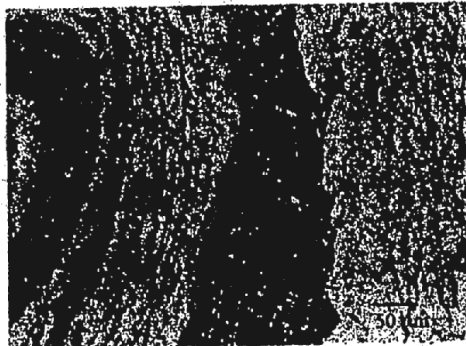
**FIG. 21A**



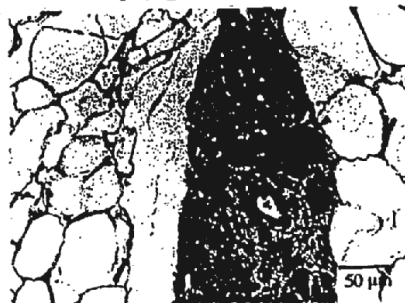
**FIG. 21B**



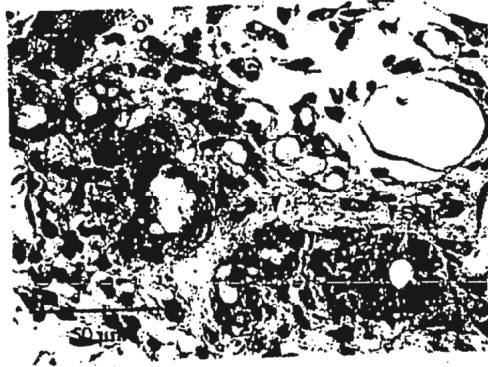
**FIG. 21C**



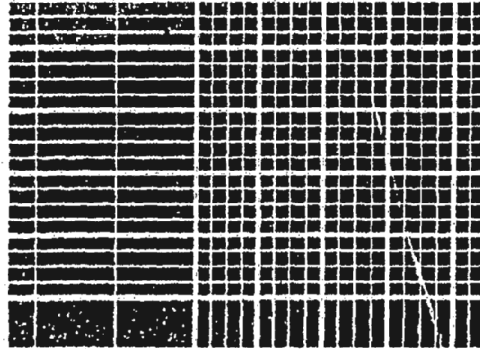
**FIG. 21D**



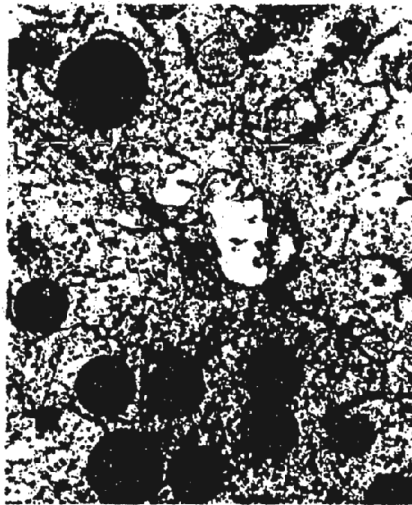
**FIG. 22**



**FIG. 23A**

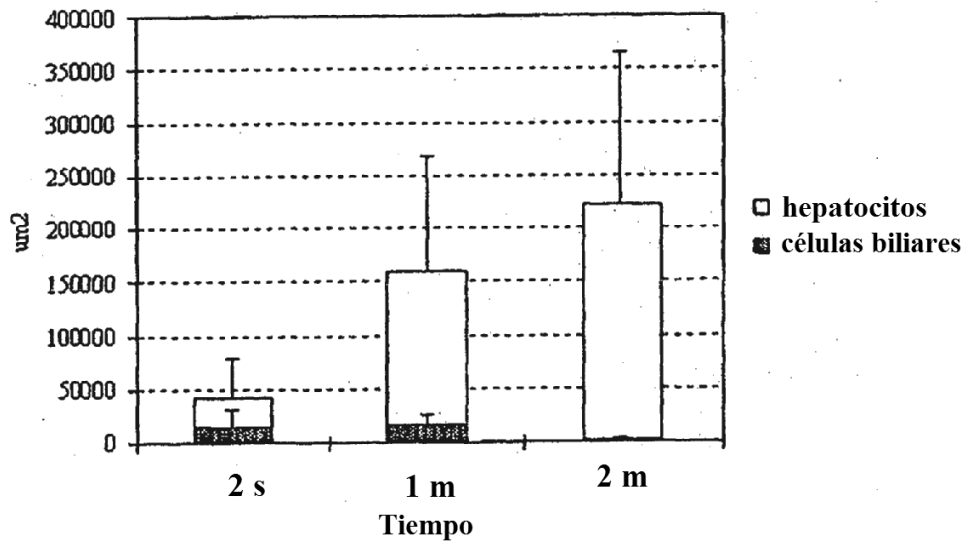


**FIG. 23B**



**FIG. 24**

**El área de construcciones implantadas**



Dispositivo de sustitución renal manipulado por ingeniería de tejidos

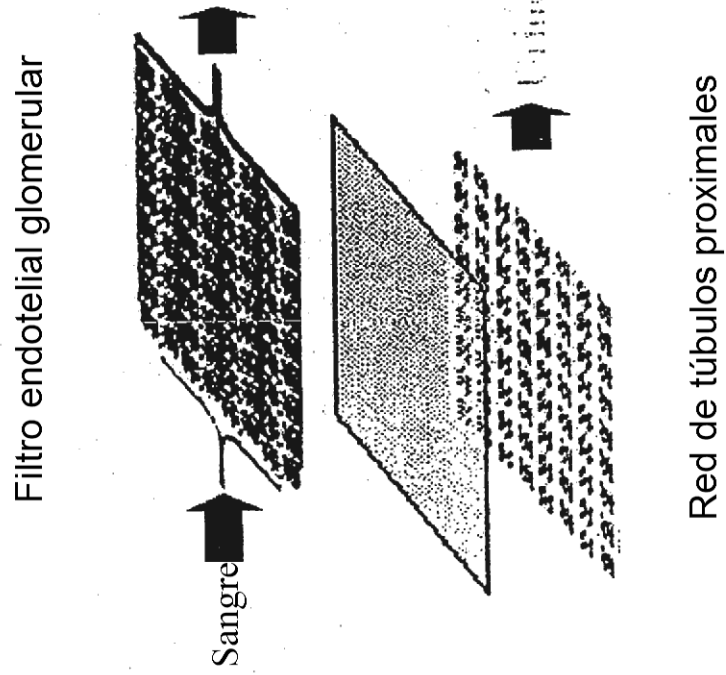


FIG. 25



Dispositivo de sustitución renal: Sección transversal

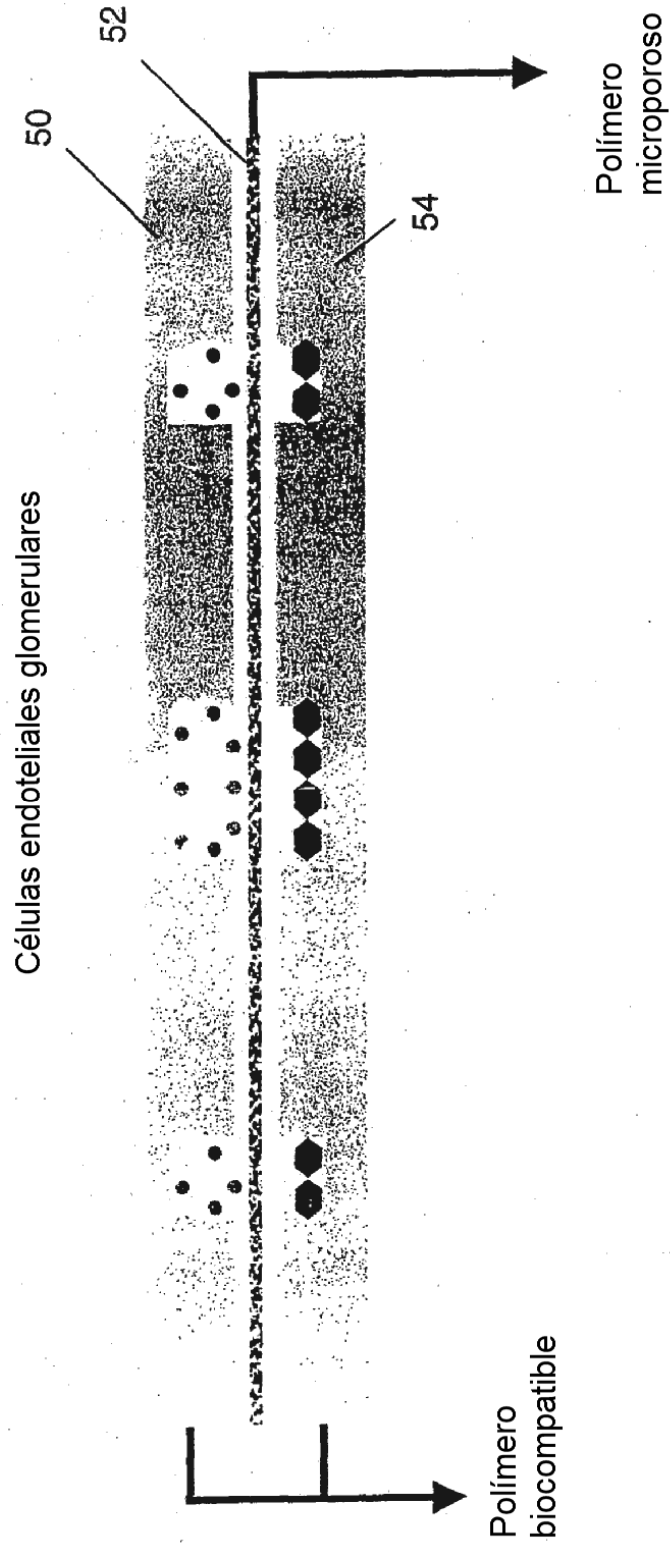
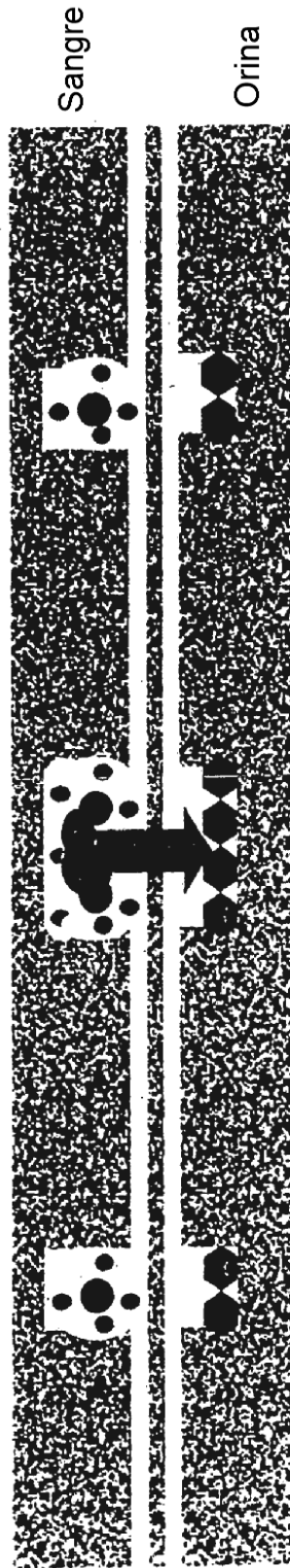


FIG. 26

Dispositivo de sustitución renal:  
Polímero biodegradable microporoso

Ultrafiltrado glomerular

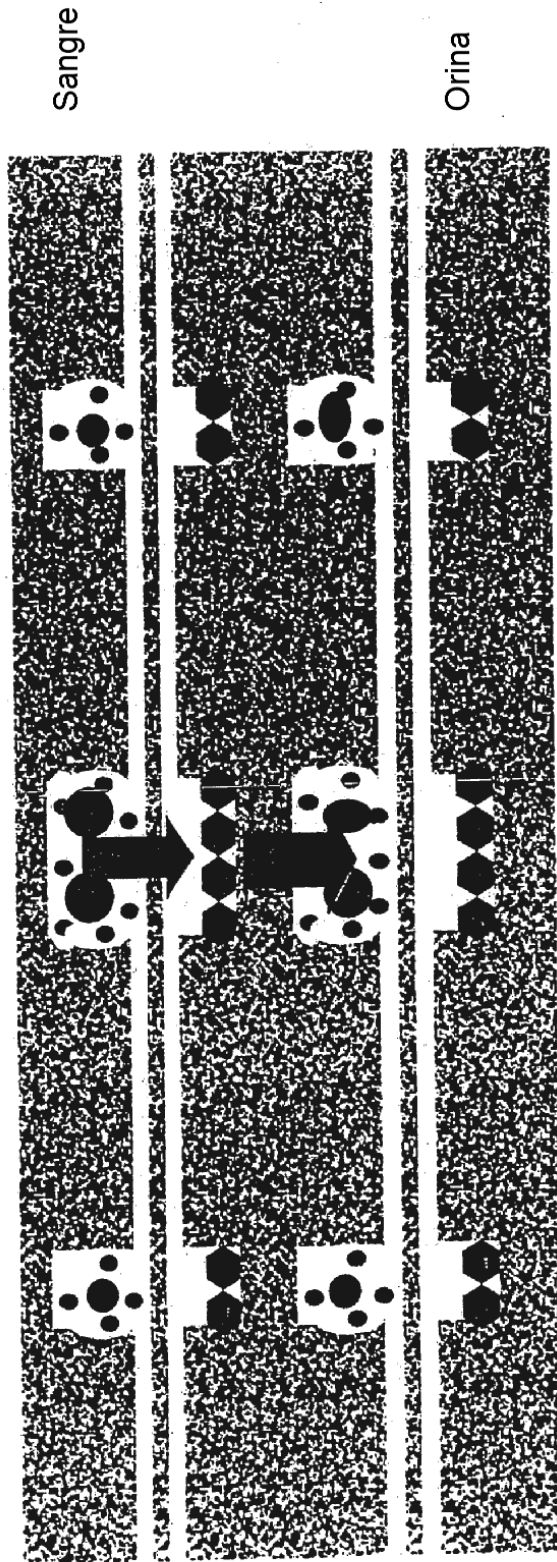


Células de los túbulos proximales

**FIG. 27**

Dispositivo de sustitución renal:  
Polímero biodegradable microporoso

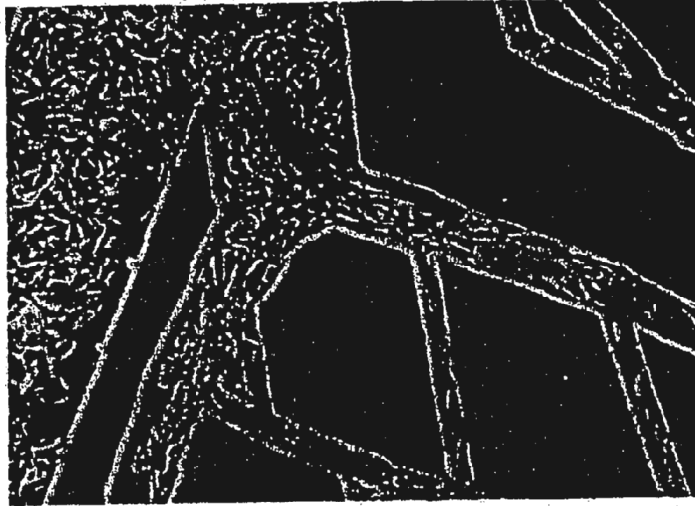
Ultrafiltrado



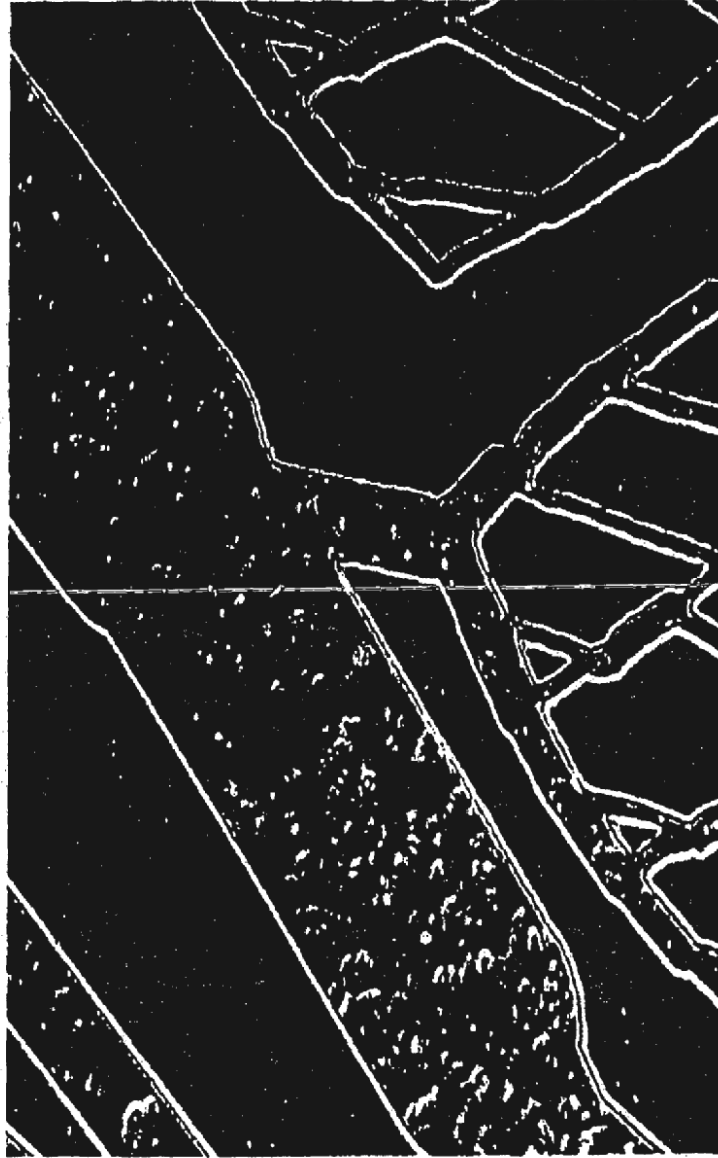
Ultrafiltrado reabsorbido

FIG. 28

**FIG. 29**



Células de los túbulos proximales en el dispositivo de PDMS Día 0 +5 h



**FIG. 30**

Células de los túbulos proximales en el dispositivo de PDMS Día 2

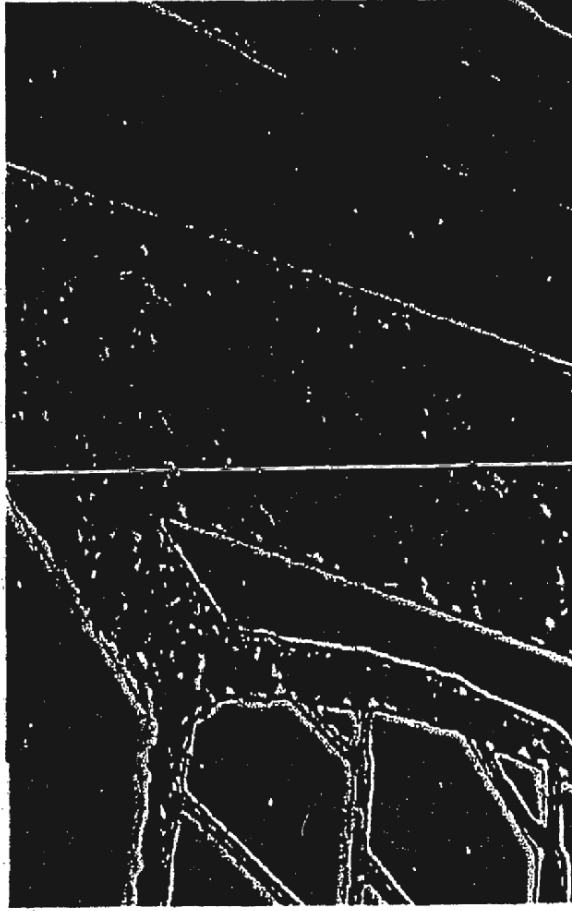
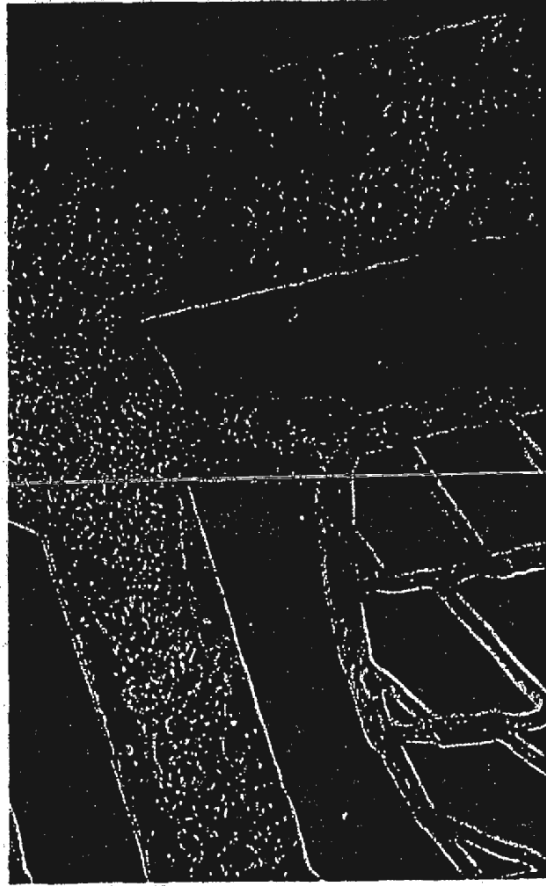


FIG. 31

Células de los túbulos proximales en el dispositivo de PDMS Día 6



**FIG. 32**