

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 615 102**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

A61K 35/44 (2006.01)

A61F 2/06 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.03.2013 PCT/IB2013/000873**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.09.2013 WO13136184**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2013 E 13732217 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016 EP 2782995**

54 Título: **Vaso sanguíneo alogénico obtenido mediante bioingeniería**

30 Prioridad:

16.03.2012 US 201261611810 P

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

05.06.2017

73 Titular/es:

**NOVAHEP AB (100.0%)
Arvid Wallgrens backe 20
41346 Gothenburg, SE**

72 Inventor/es:

**SUMITRAN-HOLGERSSON, SUCHITRA y
OLAUSSON, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 615 102 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

Vaso sanguíneo alogénico obtenido mediante bioingeniería

5 **Antecedentes**

Las enfermedades vasculares están entre los problemas de salud en aumento experimentados por millones de personas en todo el mundo. A menudo se requiere la sustitución quirúrgica de vasos sanguíneos en procedimientos quirúrgicos vasculares comunes tales como cirugía de revascularización coronaria. Las fuentes actuales de vasos sanguíneos para trasplante o implante incluyen los propios vasos sanguíneos del paciente (es decir, procedentes de las extremidades), vasos sanguíneos de tejido compatible procedente de donantes, vasos sanguíneos procedentes de animales y vasos sanguíneos artificiales o injertos sintéticos. Desgraciadamente, estas fuentes de vasos sanguíneos de sustitución tienen muchas desventajas y complicaciones, tales como vasos alogénicos utilizables insuficientes o carencia de los mismos, escasez e indisponibilidad de donantes, escasa permeabilidad, rechazo de trasplante, restricciones de longitud, inmunosupresión y complicaciones trombóticas, etc.

Por tanto, existe la necesidad de vasos sanguíneos alogénicos y métodos para su producción.

20 **Sumario**

La presente invención presenta materiales y métodos para producir un vaso sanguíneo alogénico.

La presente invención proporciona un método de recelularización de un vaso sanguíneo que comprende introducir una población de células en un vaso sanguíneo descelularizado y cultivar dicha población de células sobre el vaso sanguíneo descelularizado, recelularizando de ese modo el vaso sanguíneo.

La presente invención presenta un método para proporcionar un injerto de vaso sanguíneo a un paciente que comprende administrar una población de células derivadas del sujeto a un vaso sanguíneo descelularizado; y cultivar dicha población de células sobre el vaso sanguíneo descelularizado. En algunos aspectos, el vaso sanguíneo descelularizado procede de un donante alogénico.

En un aspecto, la población de células procede de sangre completa, médula ósea o una célula madre.

En otro aspecto, la población de células comprende células endoteliales y células del músculo liso. La célula madre es una célula que expresa CD133+.

En otro aspecto, la población de células se expande y se diferencia para dar células endoteliales y células del músculo liso *in vitro* antes de introducir las células endoteliales y las células del músculo liso en el vaso sanguíneo descelularizado.

En un aspecto adicional, la población de células se introduce en el vaso sanguíneo descelularizado mediante inyección o perfusión.

En otro aspecto, el cultivo de la población de células comprende la perfusión de medio de células endoteliales y medio de células del músculo liso. La perfusión del medio de células endoteliales y el medio de células del músculo liso se administra en alternancia. La administración en alternancia se repite al menos dos veces.

En otro aspecto, el cultivo de la población de células sobre el vaso sanguíneo descelularizado da como resultado la diferenciación de la población de células para dar células endoteliales y células del músculo liso. En algunas realizaciones, las células endoteliales revisten el exterior del vaso sanguíneo descelularizado y dichas células del músculo liso revisten la luz del vaso sanguíneo descelularizado.

En cualquiera de los métodos anteriores, las células endoteliales expresan cadherina VE, AcLDL, vWF o CD31. En cualquiera de los métodos anteriores, las células del músculo liso expresan actina o vimentina de músculo liso.

En un aspecto, el cultivo de la población de células es *in vitro*.

En un aspecto, el vaso sanguíneo es una vena o arteria.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o las pruebas de la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Además, los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no se pretende que sean limitativos.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y la descripción a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de los dibujos y la descripción detallada, y a partir de las reivindicaciones.

5 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra fotografías de la zona de operación antes y después de los procedimientos clínicos y quirúrgicos. (A) Angiografía por TC de diagnóstico antes de la operación primaria. La imagen muestra flujo portal intrahepático concentrado en la parte izquierda del hígado (i). Los vasos colaterales alimentan la vena porta pero no puede observarse la vena porta externa en continuidad (ii). El bazo está agrandado y pueden encontrarse vasos colaterales alrededor del esófago y en el hilio hepático. (B-C) Corrección quirúrgica satisfactoria usando un injerto entre la VMS y la vena porta izquierda (meso-Rex). La vena derivada de células madre está anastomosada a la VMS (i) El injerto venoso está anastomosado a la vena porta izquierda (ii) Los ultrasonidos peroperatorios muestran flujos de sangre de 25-40 cm/s en el injerto y en la vena porta intrahepática. (E) La angiografía por TC muestra un injerto permeable (i), 1 semana tras la cirugía. La imagen se ha reconstruido usando 3-4 imágenes para visualizar mejor la orientación del injerto.

La figura 2 muestra la vista macroscópica y microscópica de la vena íliaca antes y después de la descelularización. (A) Vasos sanguíneos originales obtenidos de un donante fallecido. La tinción con hematoxilina y eosina de la vena íliaca muestra la presencia de núcleos (azul) en el injerto nativo (B) y la presencia de una capa endotelial clara. La inmunohistoquímica de la misma vena muestra la presencia de CMH de clase I (C; tinción negro-marrón) pero no de CMH de clase II (D) puesto que las CE y CML do expresan de manera constitutiva CMH de clase II). (E) Una vena íliaca translúcida tras 7 ciclos de tratamiento con detergente-enzimático. Aunque el tejido descelularizado mantiene la integridad estructural, la ausencia de núcleos teñidos de azul (F), CMH de clase I (G) y CMH de clase II (H) indica que la superficie luminal así como la matriz son completamente acelulares. Se realizó análisis de citometría de flujo para detectar anticuerpos anti-células endoteliales usando el kit XM-ONE. Los histogramas representativos demuestran la ausencia de unión de anticuerpos anti-células endoteliales (I), aunque se obtuvo una reacción positiva con el suero de control positivo (J). La línea negra representa control negativo. Ampliación B-H 20 X.

La figura 3 muestra tinción por inmunofluorescencia de células endoteliales y del músculo liso del receptor crecidas sobre portaobjetos en cámara. Las células teñidas positivas para los anticuerpos son verdes, los núcleos son azules. (A) Las células endoteliales son positivas para cadherina VE, AcLDL y vWF. (B) Células del músculo liso teñidas positivas para sus marcadores específicos alfa-actina y vimentina. (A) Ampliación 40X y (B) ampliación 20X

La figura 4 muestra la vista macroscópica y microscópica de los injertos venosos obtenidos mediante bioingeniería. Fotografías macroscópicas de los dos injertos venosos obtenidos mediante bioingeniería (A-injerto 1) y (B-injerto 2). C y D controles negativos para inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. Tras dos semanas de incubación de siembra con células madre del receptor, los injertos se recelularizaron completamente (E-J) tal como se pone de manifiesto por una monocapa de CE confluyente sobre la pared del vaso y la presencia de células del músculo liso en los medios. La tinción por IHQ (marrón) de secciones de parafina del injerto 1 muestra la clara presencia de células endoteliales cubriendo el 90% de la luz (E) y las válvulas (F). (G) La presencia de células del músculo liso también es visible en los medios. La tinción por IF del injerto 2 mostró resultados similares. Se detectan CE (verde) en la luz (H) y las válvulas (I), y CML (rojo) en los medios. Ampliación 20X.

La figura 5 muestra fotos tras el trasplante. (A) La imagen muestra que un año tras el trasplante, el injerto (injerto 1) se estrechó en la vena porta pero era permeable. La imagen se ha reconstruido usando 3-4 imágenes para visualizar toda la longitud del injerto. El diámetro de la vena en la VMS (i) es de 6 mm y más próximo a la vena porta izquierda (ii) de 4 mm. (B) Se muestra el injerto primario en el sitio de la anastomosis de VMS (i). El vaso es de pared delgada y permeable. (C) El injerto primario cerca de la anastomosis de la vena porta izquierda (ii), muestra un injerto estrechado con constricción parcial por tejido del mesocolon. Por tanto, se realizó corrección quirúrgica de la desviación meso-Rex usando un segundo injerto venoso derivado de células madre. (D) La imagen muestra finalización de anastomosis de la vena porta izquierda tras disección de la vena porta adicional en el hígado usando un dispositivo de disección por ultrasonidos (CUSA) y liberando el tejido que produce la constricción en el mesocolon (iii). (E) La imagen muestra la finalización de la anastomosis distal mediante parcheado del nuevo injerto a la anastomosis de VMS antigua. Tras 24 horas, se revisó esto y se agrandó la anastomosis tras extender la abertura de la VMS. (F) Las imágenes por ultrasonidos demuestran el flujo de sangre restituido de más de 20 cm/s en el injerto (G) y un buen flujo de sangre de la vena porta intrahepática de 25-40 cm/s.

La figura 6 muestra un diagrama esquemático del biorreactor. El vaso está en el centro de la cámara, y los medios se suministran a través de los tubos tal como se muestra. El sentido de las flechas indica el flujo de las disoluciones en los tubos.

La figura 7 muestra una serie de fotografías de cuatro venas de donante (fotografías de la izquierda), tras la descelularización (fotografías centrales) y tras la recelularización (fotografías de la derecha).

La figura 8 muestra el análisis histológico mediante tinción con HE de núcleos en venas normales (paneles

superiores) y venas descelularizadas (DC, paneles inferiores). No se observó tinción para los núcleos tras 9 ciclos de descelularización.

5 La figura 9 muestra el análisis histológico mediante tinción tricrómica de Masson (MT) de venas normales (paneles superiores) y venas descelularizadas (DC, paneles inferiores). No se observó tinción para los núcleos tras 9 ciclos de descelularización. La tinción de MT también mostró la conservación del colágeno en venas descelularizadas.

10 La figura 10 muestra el análisis histológico mediante tinción de Vernhoeff Von Gieson (VVG) de venas normales (paneles superiores) y venas descelularizadas (DC, paneles inferiores). No se observó tinción para núcleos tras 9 ciclos de descelularización. La tinción de VVG también mostró la conservación de elastina (y anillo de elastina) y colágeno en venas descelularizadas.

15 La figura 11 muestra el análisis histológico mediante tinción de venas normales (paneles de la izquierda) y venas descelularizadas (DC, paneles de la derecha). La tinción mostró la conservación de colágeno I (paneles superiores) y colágeno IV (paneles inferiores) en venas descelularizadas.

20 La figura 12 muestra el análisis histológico mediante tinción de Vernhoeff Von Gieson (VVG) de venas normales (paneles de la izquierda) y venas descelularizadas (DC, paneles de la derecha). La tinción de VVG mostró la conservación de fibronectina (paneles superiores) y laminina (paneles inferiores) en venas descelularizadas.

25 La figura 13 muestra la cuantificación de niveles de ADN, colágeno y glucosaminoglucanos (GAG) tras la descelularización, tal como se determina mediante ensayos de electroforesis en gel, Sircol y biglucano, respectivamente. El gel de ADN (panel superior derecho) muestra control de marcador de tamaño molecular (L), venas descelularizadas (DC) y venas normales (N). Los niveles de colágeno se midieron mediante el ensayo Sircol: en la tabla se presentan los datos sin procesar (parte central izquierda) y la cuantificación se representa en el gráfico (parte central a la derecha). Los niveles de glucosaminoglucano (GAG) se midieron mediante el ensayo de biglucano: en la tabla se presentan los datos sin procesar (parte inferior izquierda) y la cuantificación se representa en el gráfico (parte inferior derecha).

30 La figura 14 muestra los niveles de 17 factores de crecimiento angiogénicos en venas normales en comparación con venas descelularizadas. En la tabla se presentan los datos sin procesar (izquierda) y los cuantificados en el gráfico (derecha).

35 La figura 15 muestra la tinción histológica con HE y demuestra la presencia de núcleos en las capas interna, media y externa de venas recelularizadas. Las venas recelularizadas se someten a 2 ciclos de perfusión (paneles superiores) o 4 ciclos de perfusión (paneles inferiores).

40 La figura 16 muestra la tinción histológica con tinción tricrómica de Masson (MT) y confirma la presencia de núcleos, citoplasma, y la unión de células a colágeno.

La figura 17 muestra la tinción histológica con tinción de Vernhoeff Von Gieson (VVG) y confirma la presencia de núcleos, citoplasma, y la unión de células a colágeno.

45 La figura 18 muestra la tinción por inmunofluorescencia para marcadores de células endoteliales y del músculo liso. La tinción de CD31 (paneles superiores) y VWF (paneles centrales) confirmó la presencia de células endoteliales hacia el revestimiento interior de la vena. La tinción de AML (paneles inferiores) confirmó la presencia de células del músculo liso.

50 La figura 19 muestra que tinción por inmunohistoquímica para actina del músculo liso confirmó la presencia de células del músculo liso en forma de huso en las capas media y externa de la vena.

La figura 20 muestra la tinción por inmunohistoquímica de actina del músculo liso tras la descelularización mediante desoxicolato de sodio (DCS).

55 La figura 21 muestra la tinción por inmunohistoquímica de actina del músculo liso tras la descelularización mediante desoxicolato de sodio (DCS).

60 La figura 22 muestra la tinción por inmunohistoquímica de actina del músculo liso tras la descelularización mediante desoxicolato de sodio (DCS).

65 La figura 23 muestra la cuantificación de ensayos de resistencia a la tracción y fotos de la preparación y pruebas de la vena. Los diagramas de caja y bigotes de la fuerza total medida (gráfico de la izquierda) y la elongación (gráfico de la derecha) muestran los resultados de las pruebas de tracción. VHN - Vena humana nativa; VHDC - vena humana descelularizada; y VHRC vena humana recelularizada.

Descripción detallada

- 5 La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que pueden obtenerse satisfactoriamente vasos sanguíneos adecuados para implantación quirúrgica mediante bioingeniería a partir de la vena de un donante fallecido que se descelularizó y se recelularizó posteriormente por células autólogas del receptor del injerto. Este enfoque puede considerarse para pacientes que necesitan cirugía de derivación o desviación venosa vascular debido a trombosis, insuficiencia venosa profunda crónica, obstrucción venosa o reflujo venoso. Además, esta técnica obvia la necesidad de inmunosupresión de por vida y es un enfoque clínico prometedor y seguro con grandes beneficios y menos riesgos que las soluciones anteriores de trasplante vascular.
- 10 La presente invención proporciona métodos para descelularizar un vaso sanguíneo. En el presente documento se describen métodos para la descelularización de vasos sanguíneos que engloban la retirada de las células endógenas a la vez que se conserva la integridad de la matriz extracelular (MEC). El procedimiento de descelularización tal como se describe en el presente documento utiliza el tratamiento secuencial de dos o más soluciones de alteración celular diferentes, en varios ciclos. En una realización preferida, la descelularización puede lograrse cuando no quedan núcleos, tal como se detecta mediante diversos métodos conocidos en la técnica. El vaso sanguíneo puede ser una vena o una arteria. El vaso sanguíneo puede proceder de un donante. En algunas realizaciones, el donante ha fallecido. En otras realizaciones, el donante puede ser un donante de HLA o tejido compatible.
- 15 La presente invención también proporciona métodos para la recelularización del vaso sanguíneo descelularizado, que comprenden introducir una población de células en el vaso sanguíneo descelularizado y cultivar dicha población de células sobre y en el vaso sanguíneo descelularizado. Los métodos descritos en el presente documento son útiles para la expansión de la población de células y la diferenciación de la población de células para dar células endoteliales y células del músculo liso funcionales para producir un vaso sanguíneo funcional.
- 20 En una realización, la población de células utilizada para la recelularización se deriva de células madre o progenitoras, por ejemplo, células madre o progenitoras derivadas de médula ósea, o células que expresan CD133 (células CD133+). Las células madre o progenitoras pueden expandirse y diferenciarse *in vitro* para dar células endoteliales y/o células del músculo liso mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células madre o progenitoras pueden cultivarse en presencia de determinados factores de crecimiento y complementos que inician la diferenciación para dar células endoteliales y/o células del músculo liso. En algunos aspectos, las células diferenciadas pueden no diferenciarse completamente, pero expresan al menos un marcador de célula endotelial (es decir, CD31 o vWF) o al menos un marcador célula del músculo liso (es decir, actina del músculo liso) antes de su introducción en el vaso sanguíneo descelularizado. Las células endoteliales y las células del músculo liso derivadas de la célula madre tal como se describe en el presente documento se introducen en el vaso sanguíneo descelularizado, por ejemplo, mediante perfusión. El cultivo de las células endoteliales y las células del músculo liso comprende incubar las células y el vaso sanguíneo con medio de células endoteliales o medio de células del músculo liso en ciclos alternos hasta que se logra la recelularización deseada.
- 25 La vasculogénesis posnatal es la formación de nuevos vasos sanguíneos en adultos por células progenitoras endoteliales (CPE) circulantes; y la angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de células endoteliales preexistentes (Ribatti D *et al.*, 2001). Estos dos procesos contribuyen a la formación de ramas de vasos y a estados patógenos como cicatrización de heridas, isquemia, consolidación de fracturas, crecimiento tumoral, etc., (Laschke *et al.*, 2011). Hay células endoteliales y células progenitoras endoteliales coexistiendo en la circulación en sangre completa, y las células progenitoras endoteliales contribuyen a la vascularización (Asahara T *et al.*, 1997). Además, las células progenitoras para células del músculo liso también están presentes en la sangre completa circulante (Simper D *et al.*, 2002).
- 30 En otra realización, la población de células utilizada para la recelularización procede de sangre completa. El uso de sangre completa para la regeneración de un vaso sanguíneo descelularizado, daría como resultado la recelularización eficaz de vasos sanguíneos sin necesidad de aislar y expandir subpoblaciones de células progenitoras angiogénicas de médula ósea o sangre completa. La sangre completa se introduce en el vaso sanguíneo descelularizado, por ejemplo, mediante perfusión.
- 35 Hay muchas ventajas de la presente invención con respecto a las opciones para injertos vasculares disponibles en la actualidad. La presente invención proporciona un vaso sanguíneo obtenido mediante ingeniería, autólogo, con las siguientes ventajas: 1) es no inmunogénico y por tanto tiene riesgo mínimo de rechazo de injerto o respuesta inmunitaria adversa; 2) obvia la necesidad de inmunosupresión, y por tanto hay menos riesgo para el paciente tras la cirugía y durante toda su vida; 3) no tiene restricción de longitud; 4) está disponible más fácilmente, en comparación con vasos sanguíneos de donante compatible o vasos sanguíneos autólogos; 5) está compuesto por componentes naturales (es decir, MEC, células endoteliales y células del músculo liso), y por tanto tiene cualidades superiores con respecto a la mayoría de los vasos sanguíneos sintéticos y artificiales, incluyendo conservación de factores de crecimiento angiogénicos residuales e integridad biomecánica; 6) la producción del vaso sanguíneo es escasamente invasiva en comparación con extraer un vaso sanguíneo autólogo para trasplante; 7) el uso de células de sangre completa permite un procedimiento rápido y mínimamente invasivo para el sujeto.
- 40
45
50
55
60
65

Tal como se usa en el presente documento, un "sujeto" incluye un mamífero. El mamífero puede ser, por ejemplo, cualquier mamífero, por ejemplo, un ser humano, primate, pájaro, ratón, rata, ave de corral, perro, gato, vaca, caballo, cabra, camello, oveja o un cerdo. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano. Tal como se usa en el presente documento, un "sujeto que lo necesita" es un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno vascular que requiere un injerto o trasplante vascular, o un sujeto que tienen un riesgo aumentado de desarrollar una enfermedad o trastorno vascular que requiere un injerto o trasplante vascular en relación con la población en general.

Descelularización de vasos sanguíneos

La invención proporciona métodos y materiales para descelularizar un vaso sanguíneo. Tal como se usa en el presente documento, "descelularización" se refiere al procedimiento de retirar células de un vaso sanguíneo, de manera que se mantenga la estructura tridimensional de la estructura de soporte de la matriz extracelular (MEC). Se usan métodos físicos y agentes químicos y biológicos en combinación para lisar células, a menudo seguido por una etapa de aclarado para retirar restos y desechos celulares. La descelularización eficaz viene dictada por factores tales como la densidad y organización tisular, las propiedades geométricas y biológicas deseadas para el producto final y la aplicación clínica objetivo. Los expertos en la técnica pueden optimizar la descelularización de vasos sanguíneos con conservación de la integridad y bioactividad de la MEC, por ejemplo, eligiendo agentes y técnicas específicos durante el procesamiento.

Los agentes más eficaces para la descelularización dependerán de muchos factores incluyendo la celularidad, la densidad, el contenido en lípidos y el grosor del vaso. Debe entenderse que aunque la mayoría de los agentes y métodos de retirada de células pueden alterar la composición de la MEC y producir cierto grado de alteración de la ultraestructura, se prefiere la minimización de estos efectos indeseables. Un experto en la técnica podría optimizar fácilmente el procedimiento de descelularización, tal como se describe en el presente documento, para minimizar la alteración de la estructura de soporte de la MEC.

Pueden usarse una o más disoluciones de alteración celular para descelularizar un vaso sanguíneo. Una disolución de alteración celular generalmente incluye al menos un detergente, tal como SDS, PEG o Triton X. Un detergente preferido particularmente es Triton X. Una disolución de alteración celular puede incluir agua de manera que la disolución es incompatible desde el punto de vista osmótico con las células. Alternativamente, una disolución de alteración celular puede incluir un tampón (por ejemplo, PBS) para la compatibilidad osmótica con las células. La disolución de alteración celular también puede incluir enzimas tales como, sin limitación, una o más colagenasas, una o más dispasas, una o más ADNasas o una proteasa tal como tripsina. En algunos casos, la disolución de alteración celular también o alternativamente puede incluir inhibidores de una o más enzimas (por ejemplo, inhibidores de proteasa, inhibidores de nucleasa y/o inhibidores de colagenasa).

En determinadas realizaciones, el vaso puede tratarse secuencialmente con dos o más disoluciones de alteración celular diferentes. Por ejemplo, una primera disolución de alteración celular contiene Triton X-100 al 1% (x100, Sigma, Suecia), una segunda disolución de alteración celular contiene fosfato de tri-n-butilo al 1% (TNBP) 28726.1, VWR, Suecia) y una tercera disolución de alteración celular contiene desoxirribonucleasa I (ADNasa I) 0,004 mg/ml (D7291, Sigma, Suecia). El tratamiento secuencial puede incluir repetir el tratamiento con al menos una de las disoluciones de alteración celular en la secuencia de tratamiento. En algunos aspectos, el vaso puede tratarse mediante ciclos de descelularización que comprenden el tratamiento secuencial de una o más disoluciones de alteración celular en el mismo orden hasta que se logra el nivel deseado de descelularización. En algunas realizaciones, el número preferido de ciclos de descelularización es de al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 19 o al menos 20 ciclos. El número de ciclos necesarios para la descelularización deseada se determina a través de la monitorización de la presencia de núcleos, antígenos HLA de clase I o II, y otras indicaciones de presencia de células en los vasos. El nivel de descelularización preferido se indica por la falta de núcleos presentes en el vaso sanguíneo descelularizado.

En algunas realizaciones, cada disolución de alteración celular puede comprender además componentes adicionales, tales como antibióticos (es decir, penicilina, estreptomina y anfotericina), sal disódica de ácido etilendiaminotetraacético deshidratada (EDTA) y/o fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF). Por ejemplo, una disolución de alteración celular que comprende ADNasa I también puede incluir cloruro de calcio y cloruro de magnesio (A12858, Life Technologies) para activar la enzima.

Pueden usarse métodos de perfusión para tratar el vaso con disoluciones de alteración celular para la descelularización del vaso sanguíneo. Alternar el sentido de perfusión (por ejemplo, anterógrado y retrógrado) puede ayudar a descelularizar eficazmente el vaso sanguíneo. La descelularización tal como se describe en el presente documento descelulariza esencialmente el vaso de dentro afuera, dando como resultado muy poco daño para la MEC. Dependiendo del tamaño y el peso del tejido y del/de los detergente(s) particular(es) y de la concentración del/de los detergente(s) en la disolución de alteración celular, se perfunde generalmente un vaso desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 12 horas por gramo de tejido con medio de alteración celular. Incluyendo los lavados, un órgano puede perfundirse durante desde aproximadamente 12 hasta aproximadamente 72 horas por gramo de tejido. La perfusión generalmente se ajusta a las condiciones fisiológicas incluyendo flujo

pulsátil, velocidad y presión. La descelularización por perfusión tal como se describe en el presente documento puede compararse con la descelularización por inmersión tal como se describe, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.ºs 6.753.181 y 6.376.244.

5 En una realización preferida, el vaso puede llenarse con disoluciones de alteración celular y agitarse simultáneamente para la descelularización del vaso sanguíneo. Pueden añadirse diferentes disoluciones de alteración celular en orden secuencial, y repetirse el orden múltiples veces hasta que se logra el nivel deseado de descelularización. Por ejemplo, un extremo de la vena puede mantenerse abierto mientras que el resto de las aberturas (es decir, abrasiones y ramas) se suturan para impedir una fuga. La vena puede aclararse en primer lugar en antibióticos que contienen PBS (penicilina al 0,5%, estreptomycinina al 0,5% y anfotericina B al 0,5%). Entonces, la vena puede aclararse en agua destilada durante 72 horas. Cada ciclo de descelularización consiste preferiblemente en incubación con Triton X al 1% durante 3 horas, seguido por TnBP al 1% durante 3 horas y ADNasa I 0,004 mg/ml durante tres horas. Finalmente, el vaso puede lavarse con agua destilada durante la noche para retirar desechos celulares. En cada incubación, la vena puede llenarse con la disolución de alteración celular y puede pinzarse para mantenerla cerrada. Entonces, puede colocarse la vena en un agitador a 37°C durante el tiempo de incubación (3 horas o durante la noche) con agitación suave. Al final de cada incubación, puede retirarse el contenido del vaso y aclararse el vaso con PBS. Tras 7-9 ciclos (de TritonX, ThBP, ADNasa I y lavado con agua) más agitación, puede lavarse la vena de manera continua durante 48 horas con PBS, reemplazándose el PBS cada 6 horas. Pueden utilizarse concentraciones variables de detergente (TritonX o TnBP), según sea necesario o según el criterio de un experto habitual en la técnica. Pueden utilizarse concentraciones variables de enzimas, tales como ADNasa, según sea necesario o según el criterio de un experto habitual en la técnica.

Opcionalmente, el vaso descelularizado puede esterilizarse antes de las etapas de recelularización. Por ejemplo, el vaso descelularizado se incuba en ácido peracético al 0,1% en PBS estéril durante 1 hora, seguido por lavado con agua estéril y PBS durante 4 horas con cada disolución.

Tal como se indica en el presente documento, un vaso descelularizado consiste esencialmente en componentes de la matriz extracelular (MEC) del árbol vascular. Los componentes de la MEC pueden incluir cualquiera o todos de los siguientes: fibronectina, fibrilina, laminina, elastina, miembros de la familia del colágeno (por ejemplo, colágeno I, III, y IV), glucosaminoglucanos, sustancia fundamental, fibras reticulares y trombospondina, que pueden permanecer organizados como estructuras definidas tales como la lámina basal. La descelularización satisfactoria se define como la ausencia de miofilamentos, células endoteliales, células del músculo liso y núcleos detectables en secciones histológicas usando procedimientos de tinción histológica convencionales. De manera preferible, pero no necesaria, también se han retirado los desechos celulares residuales del órgano o tejido descelularizado.

Para recelularizar y generar eficazmente un vaso sanguíneo alogénico, es importante que se mantenga la morfología y la arquitectura de la MEC (es decir, que permanezca sustancialmente intacta) durante y tras el procedimiento de descelularización. "Morfología" tal como se usa en el presente documento se refiere a la forma global del órgano o tejido o de la MEC, mientras que "arquitectura" tal como se usa en el presente documento se refiere a la superficie exterior, la superficie interior y la MEC entre ellas. La morfología y la arquitectura de la MEC pueden examinarse visual y/o histológicamente para verificar que el procedimiento de descelularización no ha comprometido la estructura tridimensional y la bioactividad de la estructura de soporte de la MEC. El análisis histológico mediante tinción (es decir, H y E, MT o VVG) puede ser útil para visualizar la arquitectura del vaso sanguíneo descelularizado y la conservación de los componentes de la MEC, tales como colágeno I, colágeno IV, laminina y fibronectina. Otros métodos y ensayos conocidos en la técnica pueden ser útiles para determinar la conservación de los componentes de la MEC, tales como glucosaminoglucanos y colágeno. Y lo que es más importante, factores de crecimiento o angiogénicos residuales permanecen asociados con la estructura de soporte de la MEC tras la descelularización. Los ejemplos de tales factores de crecimiento o angiogénicos incluyen, pero no se limitan a, VEGF-A, FRF-2, PLGF, G-CSF, FGF-1, folistatina, HGF, angiopoyetina-2, endoglina, BMP-9, HB-EGF, EGF, VEGF-C, VEGF-D, endotelina-1, leptina y otros factores de crecimiento o angiogénicos conocidos en la técnica.

Recelularización de vasos sanguíneos

55 La invención proporciona materiales y métodos para generar un vaso sanguíneo regenerado. Puede producirse un vaso sanguíneo regenerado poniendo en contacto un vaso sanguíneo descelularizado de un donante tal como se describe en el presente documento con una población de células y cultivar dicha población de células sobre y en el vaso sanguíneo descelularizado. Tal como se usa en el presente documento, "recelularización" se refiere al procedimiento de introducir o administrar células a un vaso sanguíneo descelularizado o estructura de soporte de la MEC, y cultivar las células de manera que las células proliferan y/o se diferencian para generar en última instancia un vaso sanguíneo con arquitectura, organización celular y bioactividad similar a las de los vasos sanguíneos normales.

65 La población de células tal como se usa en el presente documento puede ser cualquier célula usada para recelularizar un vaso sanguíneo descelularizado. Estas células pueden ser células totipotentes, células pluripotentes o células multipotentes, y pueden estar destinadas o no destinadas. Además, las células útiles en la presente

invencción pueden ser células indiferenciadas, células parcialmente diferenciadas o células completamente diferenciadas. Las células útiles en la presente invencción también incluyen células progenitoras, células precursoras y células madre derivadas de "adulto". Los ejemplos de células que pueden usarse para recelularizar un vaso sanguíneo incluyen, pero no se limitan a, células madre o progenitoras derivadas de médula ósea, célula mononucleares de médula ósea, células madre mesenquimatosas (CMM), células progenitoras adultas multipotentes, células madre o progenitoras derivadas de sangre completa tales como células madre endoteliales, células progenitoras endoteliales, células progenitoras de músculo liso, sangre completa, sangre periférica y cualquier población celular que pueda aislarse de sangre completa. En algunas realizaciones, la población de células usada para recelularizar el vaso sanguíneo es alogénica. "Alogénicas" tal como se usa en el presente documento se refiere a células obtenidas de la misma especie que la del órgano o tejido originado (es decir, individuos relacionados o no relacionados). En una realización particularmente preferida, las células proceden del receptor (es decir, "autólogas").

La población de células puede ser una población de células heterogénea. Por ejemplo, las células pueden ser células de sangre completa, o proceder de sangre completa. Estas células incluyen glóbulos rojos, glóbulos blancos, trombocitos, células endoteliales, células progenitoras endoteliales y células progenitoras de músculo liso. Se conoce en la técnica que las células endoteliales circulantes, las células progenitoras endoteliales y las células progenitoras para células del músculo liso pueden contribuir a la vasculogénesis y la angiogénesis. Por tanto, la aplicación de células de sangre completa puede suministrar fácilmente a un vaso sanguíneo descelularizado células que pueden expandirse y diferenciarse para dar células endoteliales y del músculo liso para la regeneración del vaso sanguíneo.

La población de células utilizada para la recelularización puede aislarse de una población de células heterogénea. En una realización, la población de células pueden ser células madre o progenitoras aisladas de médula ósea. En otra realización, la población de células pueden ser células endoteliales o células progenitoras endoteliales aisladas de sangre completa. En la técnica se conocen métodos para aislar poblaciones particulares de células de una población heterogénea. Tales métodos incluyen atrapamiento de linfocitos, gradientes de densidad, centrifugación diferencial, cromatografía de afinidad y citometría de flujo FACS. Pueden usarse marcadores conocidos en la técnica que identifican poblaciones de células de interés particulares para aislar las células de la población heterogénea. Por ejemplo, se sabe que CD133 se expresa sobre la superficie de células madre o células similares a células madre derivadas de la médula ósea. La selección de células CD133+ puede lograrse mediante la utilización de perlas MACS y anticuerpos específicos que reconocen CD133. También pueden utilizarse marcadores específicos para células progenitoras endoteliales o células progenitoras de células del músculo liso para purificar la población de células de interés.

En algunos aspectos, la población de células puede cultivarse *in vitro* antes de su introducción en el vaso sanguíneo descelularizado. El fin de cultivar *in vitro* incluye expandir los números de células y diferenciar las células para dar linajes celulares específicos de interés. En algunas realizaciones, puede aislarse primero la población de células de una población heterogénea antes de cultivar *in vitro*. En algunas realizaciones, la población de células pueden ser células madre o progenitoras derivadas de médula ósea (es decir, células CD133+) y pueden diferenciarse *in vitro* antes de su introducción en el vaso sanguíneo descelularizado. Se conocen en la técnica diversos protocolos de diferenciación e incluyen, por ejemplo, hacer crecer células en medios de crecimiento complementados con factores, agentes, moléculas o compuestos que inducen diferenciación para dar células endoteliales o células del músculo liso.

El número de células que se introduce en un vaso sanguíneo descelularizado con el fin de generar un vaso sanguíneo puede depender del tamaño (es decir, la longitud, el diámetro o el grosor) del vaso y de los tipos de células usadas para recelularización (es decir, células madre frente a células más diferenciadas, tal como sangre completa). Diferentes tipos de células pueden tener diferentes tendencias en cuanto a la densidad de población que alcanzarán esas células. A modo de ejemplo, un órgano o tejido descelularizado puede "sembrarse" con al menos aproximadamente 1.000 (por ejemplo, al menos 10.000, 100.000, 1.000.000, 10.000.000 o 100.000.000) células; o puede tener desde aproximadamente 1.000 células/mg de tejido (peso en húmedo, es decir, antes de la descelularización) hasta aproximadamente 10.000.000 células/mg de tejido (peso en húmedo) unidas al mismo.

La población de células puede introducirse ("sembrarse") en un vaso sanguíneo descelularizado mediante inyección en una o más ubicaciones. Además, puede introducirse más de un tipo de célula (es decir, células endoteliales o células del músculo liso) en un vaso sanguíneo descelularizado. Por ejemplo, las células endoteliales pueden introducirse en el exterior del vaso sanguíneo descelularizado, mientras que las células del músculo liso pueden introducirse en la luz del vaso sanguíneo. Alternativamente, o además de la inyección, la población de células puede introducirse mediante perfusión en un vaso sanguíneo descelularizado canulado. Por ejemplo, la población de células puede introducirse en un vaso sanguíneo descelularizado mediante perfusión. Tras la perfusión de las células, pueden perfundirse medios de expansión y/o diferenciación a través del vaso sanguíneo para inducir el crecimiento y/o la diferenciación de las células sembradas. En algunas realizaciones, pueden administrarse agentes anticoagulantes, tales como heparina, antes de y/o simultáneamente a la introducción de la población de células.

Los medios de expansión y diferenciación, tal como se usan en la presente invencción, incluyen un medio de

crecimiento celular que contiene complementos y factores requeridos para la proliferación de células endoteliales o células del músculo liso, y la diferenciación para dar células endoteliales o células del músculo liso. En algunas realizaciones, el medio de diferenciación para células endoteliales puede ser el mismo que el medio de crecimiento/proliferación para células endoteliales. Por ejemplo, los factores o complementos adicionales presentes en los medios de crecimiento o diferenciación endoteliales pueden incluir, pero no se limitan a: ácido ascórbico, hidrocortisona, transferrina, insulina, VEGF recombinante humano, factor de crecimiento de fibroblastos humano, factor de crecimiento epitelial humano, sulfato de gentamicina y heparina. En algunas realizaciones, el medio de diferenciación para células del músculo liso puede ser el mismo que el medio de crecimiento/proliferación para células del músculo liso. Por ejemplo, los factores o complementos adicionales presentes en los medios de crecimiento o diferenciación endoteliales pueden incluir, pero sin limitarse a: complemento de crecimiento del músculo liso, complemento de diferenciación del músculo liso, MesenPro y factor de crecimiento transformante $\beta 1$. Como mínimo, los medios de crecimiento y diferenciación comprenden medios de base (es decir, MCDB131, M231, o DMEM), suero inactivado por calor (por ejemplo, al 10%), glutamina y antibióticos (es decir, penicilina, estreptomycin, anfotericina).

En algunas realizaciones, el vaso sanguíneo sembrado puede incubarse o perfundirse con medios de células endoteliales y medios de células del músculo liso en alternancia hasta que se logra la recelularización deseada. En algunas realizaciones, la perfusión de medios de células endoteliales y medios de células del músculo liso en alternancia puede repetirse múltiples veces, por ejemplo, al menos una vez, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 11 veces, al menos 12 veces, al menos 13 veces, al menos 14 veces o al menos 15 veces. En algunas realizaciones, la duración de perfusión de los medios de células endoteliales puede ser la misma que la duración de perfusión de los medios de células del músculo liso. Alternativamente, la duración de perfusión de medios de células endoteliales puede ser diferente de la duración de perfusión de los medios de células del músculo liso. La duración de perfusión de los medios o bien de diferenciación o bien de crecimiento puede depender de las características de la población de células sembradas en el vaso sanguíneo descelularizado. Un experto en la técnica puede determinar la duración de perfusión de los medios de diferenciación y crecimiento.

Durante la recelularización, el vaso sanguíneo descelularizado puede mantenerse en condiciones en las que al menos algunas de las células sembradas pueden multiplicarse y/o diferenciarse dentro de y en el vaso sanguíneo descelularizado. Estas condiciones incluyen, sin limitación, la temperatura y/o presión apropiadas, actividad eléctrica y/o mecánica, fuerza, las cantidades apropiadas de O_2 y/o CO_2 , una cantidad apropiada de humedad, y condiciones estériles o casi estériles. Durante la recelularización, el vaso sanguíneo descelularizado y las células unidas al mismo se mantienen en un entorno adecuado. Por ejemplo, las células pueden requerir un complemento nutricional (por ejemplo, nutrientes y/o una fuente de carbono tal como glucosa), hormonas exógenas o factores de crecimiento, y/o un pH particular.

Un biorreactor para la recelularización de un vaso sanguíneo en las condiciones apropiadas, tal como se describe en el presente documento, comprende una cámara completamente cerrada que es lo suficientemente grande como para ajustar el vaso sanguíneo que va a recelularizarse y puede esterilizarse, un tubo para suministrar células y/o medios conectados a un mecanismo de bombeo (es decir, una bomba peristáltica), una estructura a la que se conecta un extremo del vaso, y 2 entradas y 2 salidas. La configuración de los tubos en relación con el vaso sanguíneo y la bomba permite que las células o los medios fluyan a través de la luz del vaso sanguíneo, y que fluyan alrededor de, o que se sumerjan en, el exterior del vaso sanguíneo. En la figura 6 se muestra un diagrama esquemático que representa la configuración de un biorreactor a modo de ejemplo.

En algunos casos, un vaso sanguíneo generado mediante los métodos descritos en el presente documento va a trasplantarse a un paciente. En estos casos, las células usadas para recelularizar un vaso sanguíneo descelularizado pueden obtenerse del paciente de manera que las células regenerativas son "autólogas" para el paciente. Las células de un paciente pueden obtenerse de, por ejemplo, sangre, médula ósea, tejidos u órganos en diferentes fases de la vida (por ejemplo, de manera prenatal, neonatal o perinatal, durante la adolescencia, o como adulto) usando métodos conocidos en la técnica. Alternativamente, las células usadas para recelularizar un órgano o tejido descelularizado pueden ser singénicas (es decir, procedentes de un gemelo idéntico) para el paciente, las células pueden ser células compatibles con el antígeno linfocitario humano (HLA) procedentes de, por ejemplo, un pariente del paciente o un individuo con HLA compatible no relacionado con el paciente, o las células pueden ser alogénicas para el paciente procedentes, por ejemplo, de un donante con HLA no compatible.

La evolución de las células sembradas puede monitorizarse durante la recelularización. Por ejemplo, puede evaluarse el número de células sobre o en el tejido o vaso sanguíneo descelularizado realizando una biopsia en uno o más puntos de tiempo durante la recelularización. Además, puede monitorizarse la cantidad de diferenciación que han experimentado las células determinando si están presentes o no diversos marcadores en una célula o en una población de células. Se conocen en la técnica marcadores asociados con diferentes tipos celulares y diferentes fases de diferenciación para esos tipos celulares, y pueden detectarse fácilmente usando anticuerpos y técnicas convencionales de inmunoensayos, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica o histología. Por ejemplo, para confirmar la presencia de células endoteliales, o células que se han diferenciado en el linaje endotelial, puede someterse a ensayo cualquier marcador endotelial conocido en la técnica. Los marcadores endoteliales preferidos

incluyen, pero no se limitan a, CD31, VWR, cadherina VE y AcLDL. Por ejemplo, para confirmar la presencia de células del músculo liso, o células que se han diferenciado en el linaje de células del músculo liso, puede someterse a ensayo cualquier marcador de células del músculo liso conocido en la técnica. Los marcadores de células del músculo liso preferidos incluyen, pero no se limitan a, actina y vimentina del músculo liso. La recelularización se logra con la expresión apropiada de al menos un marcador endotelial sobre la superficie del vaso obtenido mediante ingeniería y al menos un marcador del músculo liso en la luz del vaso obtenido mediante ingeniería.

En algunas realizaciones, puede someterse a prueba la resistencia a la tracción del vaso obtenido mediante ingeniería. Se conocen en la técnica pruebas de resistencia a la tracción. Por ejemplo, puede cortarse lateralmente un vaso obtenido mediante ingeniería para dar segmentos en anillo y someterse a prueba mediante deformación radial. Puede calcularse la fuerza total usada para romper las muestras completamente y la elongación a una fuerza total del 50% para determinar la resistencia a la tracción. En algunas realizaciones, los vasos recelularizados demuestran resistencias a la tracción aumentadas cuando se comparan con vasos descelularizados. Por ejemplo, los vasos sanguíneos obtenidos mediante ingeniería de la presente invención pueden demostrar la capacidad de resistir una fuerza total del 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 100% o más en comparación con vasos sanguíneos descelularizados. En otras realizaciones, los vasos recelularizados demuestran una resistencia a la tracción similar o aproximadamente igual que los vasos normales.

Ejemplos

Ejemplo 1: Vaso sanguíneo obtenido mediante bioingeniería usando médula ósea

Este ejemplo describe el procedimiento de meso Rex usando una vena descelularizada de donante, recelularizada con células madre autólogas, en una niña de diez años con EHPVO.

Obstrucción de vena porta extrahepática (EHPVO) es un estado con flujo de sangre hepato-pedio alterado desde la vena mesentérica superior (VMS), la vena esplénica (VE), la vena coronaria (VC) a la vena porta (VP).

Métodos

Se descubrió que una niña de un año de edad tenía trombocitopenia y esplenomegalia. Se pensó que tenía púrpura trombocitopénica idiopática (PTI) y se realizó un seguimiento durante varios años en un hospital local. Cuando tenía 9,5 años de edad se examinó adicionalmente y se confirmó la presencia de venas varicosas esofágicas y esplenomegalia. El INR estaba ligeramente elevado. La proteína S y la proteína C mostraron niveles normales, y se excluyó la resistencia a PCA. Se medicó con betabloqueantes para reducir la hipertensión portal.

La elastografía (Fibroscan) fue normal (puntuación de rigidez de 4,6). Una angiografía por TC reveló una trombosis de vena porta con circulación colateral en el ligamento hepático y una vena mesentérica superior (VMS) abierta (figura 1A). Se inició el tratamiento con betabloqueantes e inhibidores de la bomba de protones. Debido a la hipertensión portal y al desarrollo de venas varicosas esofágicas, se evaluó y aceptó para un procedimiento de derivación (meso Rex). En caso de que la vena umbilical no fuera permeable, se planeó un injerto venoso derivado de células madre autólogas como procedimiento de rescate. La alternativa sería o bien usar otro vaso procedente de la paciente o procedente de un donante alogénico, o bien realizar un trasplante de hígado, requiriendo estas dos últimas alternativas inmunosupresión de por vida. Las venas yugulares internas eran permeables en ambos lados (ultrasonidos y TC), pero la longitud estimada del injerto fue más corta que la distancia desde la vena porta izquierda hasta la VMS. El lecho vascular portal intrahepático fue difícil de visualizar. Esto podría haberse producido por los casi 9 años de EHPVO.

Descelularización de vena de donante

Se extrajo un segmento de vena de 9 cm de un donante de trasplante de órganos sano de 30 años de edad que no tenía infecciones en curso ni otras enfermedades. Un extremo de la vena se mantuvo abierto, mientras que el resto de las aberturas se suturaron para impedir una fuga. La vena se aclaró en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía penicilina al 0,5%, estreptomina al 0,5% y anfotericina B al 0,5%. Inicialmente, el tejido se aclaró en agua destilada (AD) durante 72 h. Cada ciclo de descelularización consistió en incubación con Triton X al 1% (3 h), seguido por fosfato de tri-n-butilo al 1% (3 h) y desoxirribonucleasa I 0,004 mg/ml (todos de Sigma, Gotemburgo, Suecia) en cloruro de sodio 1 M (3 h). Un extremo del injerto se mantuvo abierto mientras que el otro se pinzó y la luz se llenó con Triton X al 1% (Sigma, Gotemburgo, Suecia). Entonces se pinzó el otro extremo y se colocó en un agitador a 37°C durante 3 h con agitación suave. Al final del tiempo de incubación, se abrió un extremo de la muestra, se vació el contenido de la luz y se lavó la muestra con PBS. Se siguió el mismo procedimiento para el tratamiento con fosfato de tri-n-butilo (Sigma) y ADNasa (Sigma). Finalmente, se lavó la muestra con agua destilada durante la noche para retirar desechos celulares. Se realizaron siete ciclos. Al final del procedimiento de descelularización, se lavó el injerto de manera continua durante 48 h con PBS (cambiado cada 6 h). Todas las disoluciones usadas para la descelularización contenían los antibióticos mencionados anteriormente. Tras cada ciclo se examinó un pequeño fragmento de tejido para determinar la presencia de núcleos, antígenos HLA de clase I y II y se verificó histológicamente usando un procedimiento convencional.

Preparación de células endoteliales y del músculo liso autólogas de la receptora

Se prepararon las células autólogas de la receptora a partir de 20 ml de médula ósea obtenida de la receptora. En primer lugar se separó la médula ósea en Lymphoprep y se lavó tres veces con medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). Se aislaron las células endoteliales con perlas Mini MACS recubiertas por CD133 según las instrucciones del fabricante. Se contó el número de células CD133+ obtenidas y se sometió a prueba la viabilidad usando azul de tripano. Se cultivaron las células CD133+ en pocillos de cultivo recubiertos con gelatina al 0,2% a 37°C en una atmósfera humidificada del 95% de aire y el 5% de CO₂. Para la preparación de los medios completos: medio basal MCDB 131 + suero AB humano inactivado por calor al 10%, L-glutamina al 1% y penicilina-estreptomicina al 1% + complementado con el kit EGM-2 Single Quote (Lonza, Walquersville, MD, EE.UU.) que contenía ácido ascórbico, hidrocortisona, transferrina, insulina, factor de crecimiento endotelial vascular recombinante humano, factor de crecimiento de fibroblasto humano, factor de crecimiento epitelial humano, sulfato de gentamicina y heparina. El medio se reemplazó cada 2-3 días. Se desprendieron las células confluentes de todos los pocillos mediante tripsinización, se reunieron y se lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se tiñeron las células endoteliales de la receptora autólogas cultivadas en un primer pase con inmunofluorescencia de dos colores para cadherina VE, LDL acetilada y factor de von Willebrand, y se contratiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para confirmar el fenotipo endotelial antes de la unión a la matriz en el biorreactor.

Para las células del músculo liso, se hicieron crecer las células aisladas de médula ósea en medio de células del músculo liso disponible comercialmente (Cascade Biologics- medio 231 + complementos de factor de crecimiento, n.º de cat. S-007-25). Se contaron las células y se sembraron en matraces de 75 cm² a una densidad de 1x10⁶ por ml. Se hicieron crecer las células en medio completo y el medio se reemplazó cada 3 días. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 90%, se retiró el sobrenadante y se lavaron las células con PBS y luego se realizaron pases con tripsina-EDTA 1X. Para inducir diferenciación del músculo liso, se cambió el medio de cultivo a medio completo que contenía complemento de diferenciación de células del músculo liso (Cascade Biologics- n.º de cat. S-008-5). Se tiñeron las células del músculo liso de la receptora autólogas cultivadas con histología de inmunofluorescencia para alfa-actina y vimentina, y se contratiñeron con DAPI para confirmar el fenotipo de células del músculo liso antes de la unión a la matriz en el biorreactor.

Siembra de células

Se desprendieron las células endoteliales de los matraces de cultivo, se diluyeron en su medio específico de crecimiento y se aplicaron longitudinalmente a la superficie interna de la matriz con una microjeringa. El número medio de CE sembradas por centímetro cuadrado de superficie de injerto fue de 7,5 x 10⁴. Se pinzó el extremo abierto y se colocó la matriz sobre un dispositivo Rock'n Roller a 37°C con 5% de CO₂. Tras 3 días, se sembró la superficie interna con la misma densidad de células del músculo liso suspendidas en medio de diferenciación de células del músculo liso y se incubó adicionalmente durante 3 días. Entonces se colocó la matriz dentro de un biorreactor. Se añadió internamente medio de células endoteliales sin suero (medio libre de suero) (25 ml) y medio de diferenciación de CML libre de suero externamente (25 ml) y comenzó la rotación a 1,5 revoluciones por min (37°C, 5% de CO₂). Se cambió el medio externo e interno cada 72 h. Se sometió a prueba el medio extraído para determinar la colonización microbiana usando un kit disponible comercialmente (Invitrogen, Suecia, n.º de cat. C-7028). El periodo total del cultivo en el biorreactor fue de dos semanas.

Procedimiento quirúrgico

La operación se planeó para una fecha en la que el injerto venoso estaba listo. Se transfirió a disolución de almacenamiento fría desde el biorreactor en el momento de la cirugía. Se abrió a la paciente con una incisión de tipo Mercedes para exponer el hilio y el ligamento hepáticos. Se movilizó cuidadosamente el ligamento redondo desde el ombligo hasta el hígado. Se encontró la vena umbilical y era muy pequeña y sólo parcialmente permeable. Se encontraron venas varicosas en la parte izquierda del abdomen y el bazo agrandado llenaba el hipocondrio izquierdo. Las venas varicosas eran de escasa calidad y no adecuadas para derivación. No se exploró la longitud preoperatoria de la vena yugular debido a la longitud demasiado corta estimada para la derivación.

Se comenzó la disección del hilio, seguido por el ligamento redondo debajo de la vena porta izquierda que se encontró que era permeable. La vena porta derecha extrahepática era delgada y no se encontró una vena porta común por encima del páncreas. La disección adicional de la vena porta izquierda incluyó la abertura de la vena umbilical en la unión. Se encontró que podía retirarse un ligamento fibroso con dilatación, revelando una buena vena porta izquierda con buen flujo de retorno. Se dilató la luz hasta 15 mm. No se identificó la vena porta derecha y se observaron pequeñas ramas del segmento tres al segmento cuatro.

La siguiente etapa incluyó encontrar la vena mesentérica superior (VMS). Se identificó el ligamento de Treitz y se movilizó el duodeno para exponer la vena mesentérica inferior. Siguiendo esta vena, pudieron movilizarse fácilmente la vena esplénica y la VMS. La VMS era permeable y agrandada.

La decisión de usar la vena derivada de células madres se tomó debido a no haber una alternativa buena usando las propias venas de la niña sin mucha cirugía adicional usando una combinación de venas yugular, ilíaca o safena. Sin derivación, la opción sería el trasplante de hígado o de múltiples vísceras.

5 La vena sembrada de células madre se llevó al quirófano. Se seleccionó una longitud adecuada del injerto con forma de Y y se preparó para derivación. En primer lugar se llevó a cabo la anastomosis con la VMS pinzando la VMS tras la movilización. Se suturó el injerto con 5-0 Surgipro® extremo con lado y después se liberó el pinzamiento con una pinza vascular en el injerto (figura 1B). Se colocó el injerto sobre el páncreas pero bajo el colon y el estómago. Se movió la pinza vascular en etapas para asegurar un injerto sin fugas. A continuación, se colocó una pinza sobre la
10 vena porta izquierda intrahepática y se sometió el injerto a anastomosis con vena porta (figura 1C). El injerto era más grande que la vena porta, pero esto se solucionó ajustando las suturas.

Monitorización posoperatoria

15 La reperusión se realizó sin problemas. Se midieron intraoperatoriamente buenos flujos sanguíneos de 25-30 cm/s en la vena porta y de 40 cm/s en la arteria y se confirmaron con ultrasonidos (figura 1D). La presión intraoperatoria de la vena porta fue de 20 mm Hg al comienzo del procedimiento, pero no se midió tras la reperusión de la vena porta. Se realizó un seguimiento de la paciente con ultrasonidos dos veces al día de la primera semana y luego diariamente durante la segunda semana. Los flujos sanguíneos alcanzaron hasta 80 cm/s en algunas ramas portales
20 izquierdas, mientras que se observaron flujos inferiores de 15 cm/s en la vena porta derecha. El injerto se visualizó usando angiografía por TC una semana tras la cirugía y se encontró que era permeable (figura 1E). Un examen por ultrasonidos posoperatorio observó un contorno cambiado de la pared del vaso en el sitio de la anastomosis portal en el día siete posoperatorio y el radiólogo no pudo descartar una trombosis en este sitio. Por tanto, se administró a la paciente de manera posoperatoria Heparin® 1000IE 6 veces al día por vía intravenosa y se realizó un seguimiento
25 con ultrasonidos dos veces al día para monitorizar este hallazgo. Tras algunos días, la paciente presentaba sangrado en la zona del vendaje de la herida y una disminución en la hemoglobina, pero no necesitó transfusión de sangre. Se encontró que el TTPa era >210 el mismo día, probablemente producido por el tratamiento con heparina, y por tanto se detuvo temporalmente. Se monitorizó a la paciente de manera continua durante el primer mes, con análisis de sangre secuenciales para determinar antígenos del donante, enzimas hepáticas y se realizó obtención de imágenes de la velocidad del flujo de sangre usando ultrasonidos. Se realizaron pruebas similares a los 3, 6, 9 y 12
30 meses tras el trasplante.

Examen de anticuerpos anti-células endoteliales

35 Se realizó un examen para determinar la presencia anticuerpos anti-células endoteliales tanto antes como después del trasplante. Se recogieron muestras de suero de un mes antes a 1 y 3 semanas, 1, 3, 6, 9 y 12 meses tras el trasplante. En cada ocasión, se aislaron nuevamente células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que expresaban el receptor Tie-2 de angiopoyetina de muestras de sangre de la paciente usando el kit comercial XM-ONE® según las instrucciones del fabricante (AbSorber AB, Estocolmo, Suecia). Se analizaron las células
40 inmediatamente en un citómetro de flujo Guava (Millipore, Gotemburgo, Suecia) usando el software de análisis Guava. El suero de un hombre sano con grupo sanguíneo AB no transfundido que se sabía que no tenía ningún anticuerpo sirvió como control negativo. Como control positivo se usó un conjunto de sueros de pacientes que habían formado aloanticuerpos como resultado de múltiples transfusiones de sangre o trasplantes de órganos. También se usaron linfocitos congelados de donante cadavérico como dianas para el examen de anticuerpo anti-
45 HLA de donante y anticuerpos anti-células endoteliales tal como se describió anteriormente.

Resultados

50 Usando Triton, TnBP y ADNasa, se descélularizó satisfactoriamente la vena de donante tras siete ciclos. En las figuras 2A-H se muestra la morfología macroscópica de la vena ilíaca antes y después de la descélularización. Sin embargo, la arquitectura de la vena descélularizada fue diferente de la control nativa (figura 2B). No se encontraron núcleos ni expresión de antígenos HLA de clase I o II sobre el injerto venoso descélularizado al final de ciclo 7 (figuras 2F-H). Todo el procedimiento de descélularización llevó 12 días; al final de los cuales se encontró que la vena se había descélularizado satisfactoriamente (basándose en hallazgos histológicos). Las células madre CD133+
55 aisladas de la médula ósea de la paciente se diferenciaron muy fácilmente para dar células endoteliales maduras que expresaban cadherina VE, AcLDL y vWF (figura 3). De manera similar, pudieron hacerse crecer satisfactoriamente células del músculo liso a partir de células de la médula ósea, que después se diferenciaron para dar células que expresaban alfa-actina y vimentina del músculo liso (figura 3). El tiempo total para el aislamiento y la expansión de CE y CML fue de aproximadamente 15 días.

60 Se usaron ambos tipos de células en el pase 4 para la recélularización del injerto venoso. En las figuras 4A y B se muestran fotos macroscópicas de los dos injertos usados. Todas las células se caracterizaron una vez de nuevo inmediatamente antes de la siembra y se encontró que expresaban los marcadores fenotípicos requeridos. En la vena recélularizada se encontraron CE en la luz, mientras que las CML habían migrado a las paredes del tejido tal como se detectó mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia (figura 4). Además, ambos tipos celulares expresaron sus marcadores específicos tras el cultivo en el biorreactor (figuras 4E-H). Tal como se observa en esta
65

figura, se encontró que aproximadamente el 80-90% de la luz estaba cubierta por una capa endotelial antes de la implantación en la paciente. También se encontró que la mayoría de las válvulas en el injerto estaban re-
 endotelializadas (figuras 4E y 4H). Basándose en estos resultados, se decidió continuar con el trasplante. El tiempo
 total para la preparación del injerto para el trasplante tras la aspiración de médula ósea incluyendo el cultivo en el
 biorreactor fue de aproximadamente un mes.

Se dio el alta a la paciente 3 semanas tras el procedimiento con normal pruebas de función hepática (LFT) normales
 excepto el INR (1,4). Respondió más rápidamente y estaba más alerta que antes del trasplante. A las 4,5 semanas
 de seguimiento, la paciente tenía valores hepáticos normales incluyendo el INR (1,2), que había mejorado desde 1,4
 antes de la operación. Estaba notablemente menos cansada y sus padres informaron de una calidad de vida
 mejorada. En la revisión a los 3 y 6 meses, la paciente estaba bien con un injerto permeable comprobado por
 ultrasonidos y pruebas analíticas normales. No hubo detección de ningún anticuerpo anti-células endoteliales antes
 y/o después del trasplante (figuras 2I y J). Tras la revisión a los 6 meses, la paciente estaba más cansada; sin
 embargo las pruebas analíticas fueron normales, excepto por un recuento de plaquetas disminuido. Una angiografía
 por TC, realizada tras la visita, mostró que la luz había disminuido desde 8 mm hasta 4 - 6 mm (figura 5A). Una
 prueba de ultrasonidos confirmó un flujo portal disminuido. Se tomó la decisión de explorar a la paciente tras una
 discusión a fondo con el equipo pediátrico y los padres.

Un año tras el procedimiento primario, se exploró de nuevo a la paciente. Se decidió, si era posible, corregir el injerto
 estrechado o usar una vena autóloga alternativa de la vena yugular interna en el lado izquierdo. Como precaución,
 se preparó una nueva vena derivada de células madre tal como se describió anteriormente tras adquirir los permisos
 necesarios (véanse las figuras 4B y H-J).

En el sitio de las anastomosis con la VMS, se encontró un injerto permeable con un diámetro de 8 mm (figura 5B). El
 injerto se comprimió en el sitio de paso a través del mesocolon, para permitir que el vaso "se enganchara" en el
 tejido detrás del injerto. La parte restante del injerto con la vena porta izquierda se estrechó hasta 4-6 mm de
 diámetro pero era permeable (figura 5C). El injerto parecía normal con paredes delgadas. Se detectó un
 engrosamiento del retroperitoneo en el sitio de la VMS, tal como se había anotado un año antes en las notas
 quirúrgicas del procedimiento primario. Una vez que se retiró el tejido que producía la compresión del vaso, se dilató
 adicionalmente el injerto, pero debido al acortamiento del injerto cerca de la anastomosis portal izquierda, la mejor
 solución fue colocar una nueva vena en este sitio y explorar la anastomosis al mismo tiempo. Se consideró que la
 vena yugular interna era demasiado corta. Por tanto, se tomó la decisión de usar el injerto venoso derivado de
 células madre recién preparado.

Se colocó un nuevo injerto procedente del hilio tras diseccionar la vena porta izquierda incluso más en el hígado,
 usando un dispositivo de disección por ultrasonidos (CUSA) y parcheando la anastomosis de VMS (figuras 4D y E).
 Pudieron registrarse flujos sanguíneos de más de 20 cm/s en el injerto y la vena porta de manera peroperatoria y
 posoperatoria (figuras 4F y G). Se exploró a la paciente 24 horas tras la cirugía debido a un flujo sanguíneo
 reducido. La anastomosis distal con la VMS tenía un coágulo y volvió a realizarse. La presión portal era de 20 mm
 Hg antes de la cirugía y de 13 mm Hg tras la reperfusión del injerto. Se ligaron los vasos colaterales a lo largo de la
 curvatura menor y mayor del estómago antes de cerrar a la paciente. La paciente no recibió ningún fármaco
 inmunosupresor, pero recibió 75 mg de ácido salicílico una vez al día y 10 mg de omeprazol durante 6 meses tras la
 operación primaria. Se retiró el betabloqueante al día siguiente de la cirugía. Tras la segunda operación, se
 administró a la paciente heparina por vía intravenosa durante 2 semanas, y se administraron anticoagulantes
 durante 6-12 meses tras el procedimiento.

La paciente ha mostrado mejora tanto en altura como en peso y ha crecido en un año desde 137 cm hasta 142,5 cm
 y ha aumentado de peso desde 30,2 kg hasta 35 kg.

Discusión

Estos resultados demostraron la recelularización satisfactoria de una vena ilíaca humana descelularizada usando
 células madre autólogas, que posteriormente se usaron para un procedimiento de derivación entre la vena
 mesentérica superior y la vena porta izquierda intrahepática en una paciente con trombosis de vena porta.

Los resultados de histología mostraron que la descelularización con Triton-X-TnBP y ADNasa es completa y permite
 la conservación adecuada de la matriz extracelular. Ya tras 4 ciclos, las venas humanas pueden descelularizarse
 con restos de núcleos. También se encontró que el uso de Triton-X-TnBP en lugar de desoxicolato de Na
 conservaba la matriz extracelular mucho mejor tal como elastina y fibronectina. Por tanto, se aplicó
 satisfactoriamente un protocolo de descelularización a tejido venoso humano tal como se verifica por la ausencia de
 células de donante.

Se postuló que la migración *in vitro* de células del músculo liso a los medios se facilitaría en presencia de un
 endotelio intacto. Por tanto, en primer lugar, se sembraron las células endoteliales que formaron una capa sobre el
 injerto en el plazo de 3 días. Tras esto, se sembraron las células del músculo liso en la luz de la vena y se encontró
 que estas células se incluían tras 24 h. Sin embargo, la recelularización completa de la vena llevó un total de 2

semanas. No se realizó siembra externa de CML puesto que se encontró que el enfoque había repoblado satisfactoriamente los medios de la vena con CML. Aunque la nueva siembra de la vena descelularizada no se realizó usando perfusión, esto es importante. Se sabe que se requiere tensión de corte para un revestimiento de CE óptimo en la luz. Se desarrolla el uso de recelularización por perfusión para vasos sanguíneos.

Los datos constituyen la prueba del concepto de que pueden volver a obtenerse mediante ingeniería tejidos humanos alogénicos procedentes de donantes fallecidos usando células madre autólogas para trasplantes "personalizados" o adaptados satisfactorios. Además, se desarrollan nuevas áreas de investigación que reproducen arterias para su uso quirúrgico en pacientes con fístulas arteriovenosas para cirugía de derivación coronaria o diálisis.

Ejemplo 2: Vaso sanguíneo alogénico usando sangre completa

La vasculogénesis posnatal es la formación de nuevos vasos sanguíneos en adultos a la que contribuyen células progenitoras endoteliales (CPE) circulantes y la angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de las células endoteliales preexistentes. Estos dos procesos contribuyen en la formación de ramificaciones de vasos y en estados patogénicos como curación de heridas, isquemia, curación de fracturas, crecimiento tumoral, etc. Hay células endoteliales y células progenitoras endoteliales coexistiendo en la circulación, y las células progenitoras endoteliales contribuyen a la vascularización. Además, están también presentes células progenitoras para células del músculo liso, otro tipo de célula importante en vasos sanguíneos, en la sangre circulante.

Se desarrolló un procedimiento fiable y reproducible que era clínicamente viable globalmente. Puesto que están presentes células angiogénicas circulantes en la sangre completa, el uso de sangre completa para la regeneración de venas dio como resultado una recelularización eficaz de vasos sanguíneos sin la necesidad de aislar y expandir subpoblaciones de células progenitoras angiogénicas a partir de médula ósea o sangre completa.

En la presente invención, se descelularizaron 5 venas iliacas humanas mediante una combinación de perfusión y agitación y luego se recelularizaron perfundiendo con sangre periférica completa seguido por perfusión con medios de crecimiento de células endoteliales y de músculo liso respectivamente. Se confirmó el proceso de recelularización satisfactorio mediante la presencia de células endoteliales y del músculo liso y también las propiedades mecánicas. Para someter a prueba la permeabilidad *in vivo*, se seleccionaron dos pacientes que padecían obstrucción de la vena porta extrahepática (EPHVO) y se trasplantó una vena obtenida mediante ingeniería de tejidos regenerada usando sangre periférica autóloga. Se siguieron los pacientes durante 8 y 6 meses. Los resultados demostraron el potencial clínico de este método en el tratamiento de pacientes con vascular enfermedades.

Materiales y métodos

Descelularización de venas

Se recuperaron venas iliacas humanas de aproximadamente 7-9 cm de donantes de órganos cadavéricos, se almacenaron en PBS estéril con antibióticos y se transportaron al laboratorio. Se lavaron las venas inmediatamente con agua destilada para retirar la sangre completa. Se conectaron ambos extremos de la vena al conector con tapa y se suturaron las otras abrasiones, ramificaciones impidiendo las fugas. El ciclo de descelularización comprendía la agitación de las venas con triton-x 100 al 1% (x100, Sigma, Suecia), fosfato de tri-n-butilo al 1% (TNBP) (28726.291, VWR, Suecia) y desoxirribonucleasa I 4 mg/l (ADNasa I) (D7291, Sigma, Suecia) durante 4 h con cada disolución en un agitador a una velocidad de 160 RPM a 37°C. Se prepararon las disoluciones de Triton y TNBP en agua destilada que contenía los antibióticos penicilina 200 U/ml, estreptomycin 0,2 mg/ml y anfotericina 2 ug/ml (Suecia), sal de sodio de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) deshidratado 5 mM (ED2SS, Sigma, Suecia) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,4 mM (PMSF) (93482, Sigma, Suecia). Se preparó la disolución de ADNasa I en PBS de Dulbeco con cloruro de calcio y cloruro de magnesio (A12858, Life technologies). Se continuó la descelularización durante 9 ciclos con lavado entre cada ciclo mediante perfusión con agua destilada. Tras la descelularización, se esterilizó el tejido con ácido peracético al 0,1% en PBS estéril durante 1 h seguido por lavado con agua destilada estéril y PBS durante 24 h con cada disolución.

Caracterización de venas descelularizadas

Tras 9 ciclos, se tomaron biopsias a partir de venas descelularizadas y se procesaron para los análisis de inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, cuantificación de ADN, luminex, microscopía electrónica de transmisión y barrido, resistencia a la tracción y cuantificaciones de la matriz extracelular.

Histología, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

Se procesaron biopsias de venas normales, descelularizadas y recelularizadas siguiendo el mismo protocolo. Se fijaron las biopsias en formalina tamponada al 4% durante 48 h para preparar bloques de parafina y OCT de tecnología de tejidos para preparar criobloques y se congelaron en nitrógeno líquido. Se cortaron la parafina y criosecciones de 5 um de grosor para las tinciones. Se tiñeron las secciones de parafina tras la rehidratación en

series descendentes de alcoholes con hematoxilina-eosina (HE), tricrómica de Masson (MT), tinción de Vernhoeff von gieson (VVG) e inmunohistoquímica. En la tinción con HE se incubaron los portaobjetos en hematoxilina de Meyer y eosina alcohólica durante 7 y 1 min respectivamente, seguido por lavado con agua destilada entre medias durante 10 min, después se deshidrataron y se montaron. Se realizaron las tinciones de MT (25088-1, Polysciences, Alemania) y VVG (25089-1, Polysciences, Alemania) según las instrucciones del fabricante.

Se realizó la inmunohistoquímica para observar las proteínas de la MEC y la actina del músculo liso. El protocolo seguido fue según las instrucciones del fabricante y las concentraciones de anticuerpo primario fueron colágeno I (1:100), colágeno IV (1:500), fibronectina (1:500), laminina (1:100) y actina del músculo liso (1:50).

Cuantificación de ADN

Se recogieron aproximadamente 20 mg de cinco biopsias normales y cinco descelularizadas de cinco venas diferentes y se aisló el ADN siguiendo el protocolo del kit de tejido y sangre DNeasy (69506, Qiagen, Suecia). Se midió la cantidad de ADN presente con nanodrop.

Luminex

Se cuantificó un panel de 17 factores de crecimiento angiogénicos en tres tejidos de vena normal y se compararon con tres tejidos de vena descelularizada. Se tomaron aproximadamente 30 mg de muestra de tejido y se aisló la proteína total (2140, Millipore, Alemania). Se midió la cantidad de proteína mediante el método de Bradford con un conjunto de patrones de BSA y se midió a 595 nm usando un lector de ELISA (Synergy2, Biotek, EE.UU.). Se normalizó la cantidad de proteína de todos los tejidos a la misma concentración con tampón TM (millipore) y se cargó sobre una placa luminex. Se realizó luminex según el protocolo del proveedor de panel 1 de perlas magnéticas de factor de crecimiento/angiogénesis humana (Millipore, Suecia). En resumen, se activó la placa de luminex con 200 ul de tampón de ensayo. Se añadieron 25 ul de proteína normalizada, patrones y controles a los respectivos pocillos, en donde se usó tampón de ensayo como blanco. Se diluyeron las muestras en los pocillos con 25 ul de tampón de ensayo mientras que se diluyeron los patrones y controles con 25 ul de tampón TM. Se agitaron con vórtex las perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo y se añadieron 25 ul de perlas a todos los pocillos y se incubaron durante 20 h a 4°C en un agitador de placa suave. La placa reposó sobre el imán durante 1 min y se lavó con tampón de lavado. Se añadieron 25 ul de anticuerpos de detección y se incubaron durante 1 h seguido por la adición de 25 ul de estreptavidina-ficoeritrina y se incubaron durante 30 min. Se lavó la placa posteriormente con tampón de lavado siguiendo las instrucciones de lavado y se añadieron 100 ul de fluido envolvente a todos los pocillos y se suspenden las perlas magnéticas agitando durante 5 min y se leen en luminex.

Cuantificación de colágeno y GAG

Se realizó la cuantificación de colágeno y GAG usando el kit de ensayo de colágeno Sircol y el kit de ensayo de GAG Biglycan de la empresa Biocolor. En resumen, se extrajo el colágeno con pepsina disuelta en ácido acético durante 24 h a partir de aproximadamente 20 mg de tejido y se concentraron y purificaron con reactivo de concentración. Se saturó el colágeno extraído con 1 ml de reactivo de colorante sircol seguido por lavado con reactivo de lavado de ácido-sal. Se liberó el sedimento de colágeno-colorante en reactivo alcalino y se leyó a 555 nm (Synergy2, Biotek, EE.UU.). Se extrajeron los GAG a partir de 20 mg de tejido en reactivo de extracción de papaína durante 3 h a 65°C. Se saturaron los GAG extraídos con 1 ml de reactivo de colorante biglycan durante 30 min sobre un agitador y luego se centrifugaron para sedimentar el complejo de GAG-colorante. Se liberó el colorante unido en 0,5 ml de reactivo de disociación de colorante y se leyó a 656 nm (Synergy2, Biotek, EE.UU.). Se cuantificaron el colágeno y los GAG basándose en un gráfico patrón con concentraciones conocidas de colágeno y GAG suministrado en el kit.

Medición de la resistencia a la tracción

Se sometieron a prueba de tracción segmentos de vena con un instrumento Instron 5566 (Instron, Norwood EE.UU.). La precarga fue de 0,1 N y la velocidad de prueba usada fue de 50 mm/minuto. La precisión del medidor de tracción es del 0,5% en fuerza y el 0,5% en elongación. Se cortó la vena para dar muestras con forma de anillo de aproximadamente 4 mm de ancho. Se midió la anchura más pequeña de las secciones con un calibre y se registró. Se colocaron dos agarres cilíndricos de 5 mm (cada uno de 2,5 mm de alto y 5 mm de ancho) dentro de las muestras de anillo antes de realizar la deformación radial. Se normalizó la fuerza dividiendo la fuerza medida entre la anchura más pequeña de los anillos, puesto que ésta es la parte que experimenta la carga (no se calculó la tensión puesto que se consideró que la pared del vaso sanguíneo era demasiado no homogénea). También se midió la elongación de las muestras tras la precarga. Se calculó la fuerza total usada para romper las muestras completamente y la elongación al 50% de fuerza total.

Biorreactor

Se preparó un biorreactor de manera interna en el laboratorio dependiendo de las dimensiones de las venas. El biorreactor consistía en una configuración cerrada de tubo de polipropileno conectado a tubos de polietileno y silicio.

Se esterilizaron el biorreactor y los tubos en un autoclave antes de su uso. Se perfundieron sangre y medios a una velocidad de 2 ml/min usando una bomba peristáltica.

5 Se diseñó el biorreactor de manera que la vena se ajustase dentro de una cámara completamente cerrada y todos los medios requeridos pudieran suministrarse a través de tuberías con una bomba peristáltica (figura 6). El biorreactor incluye un tubo de aproximadamente 15 cm, 2 tapas cada una con 1 entrada y 1 salida, una estructura con forma cónica hecha de caucho que puede conectarse a las entradas y 2 mordazas que impiden la fuga de ambas tapas. Las 2 tapas están diseñadas de un modo que las entradas pasarán a través de la tapa dentro y fuera de modo que la tubería puede conectarse fácilmente desde el exterior y el caucho con forma cónica puede fijarse al lado interior al que se unió la vena. Las salidas se extenderán justo hasta el exterior y recogerán medio de la superficie. Se usó la salida en la tapa inferior para recoger la tubería de medio y puede conectarse desde el exterior fácilmente en donde la salida para la tapa superior tiene un diámetro un poco más grande y la tubería puede pasar a través de la misma pero mantiene la estanqueidad. Se usa para tirar del recipiente desde el interior y mantenerlo recto y extendido. Un extremo de la vena se conecta en primer lugar a un caucho con forma cónica y se fija a la entrada y el segundo extremo se conecta a un conector que contiene una tubería que pasa a través de la salida de la tapa superior. El medio de perfusión entra en el vaso a través de la entrada desde la parte inferior y pasa a través del vaso y sale a través de la tubería por medio de la tapa superior y entra en el biorreactor de nuevo a través de la entrada de la tapa superior llenando así el exterior de la vena también con el mismo medio. Cuando se llena el exterior de la vena, se pone boca abajo el biorreactor y tras llenarse se pone de nuevo en posición normal y se conecta a la tubería de entrada con un conector. Todas las partes de biorreactor y tuberías se esterilizan con autoclave antes de su uso.

Recogida de sangre

25 En el día de la recelularización, se recogieron 30 ml de sangre de cada donante sano (grupo de edad de 25-35) en tubos Vacutainer estériles recubiertos de heparina y se transportaron al laboratorio tan pronto como fuera posible. El volumen de sangre requerida depende de la longitud del vaso y la longitud de las tuberías. Una vena de 9 cm de longitud y 1 cm de diámetro puede recelularizarse con 30 ml de sangre. La sangre recogida de ambas arterias de venas puede usarse para la recelularización.

Recelularización de venas

35 Se realizó todo el proceso de recelularización en condiciones muy estériles y se llevaron a cabo todas las perfusiones en un incubador a 37°C al que se le suministró el 5% de CO₂. Antes de la recelularización, se perfundieron las venas con heparina (Leo) a una concentración de PBS 50 UI/ml durante 2 h. Se retiró por drenado la heparina y se perfundió inmediatamente sangre completa durante 48 h a una velocidad de 2 ml/min. Entonces se retiró la sangre por drenado y se lavó la vena con PBS que contenía penicilina-estreptomicina-anfotericina al 1% durante 3-5 min o hasta que se retiró completamente la sangre. Se perfundió posteriormente la vena 12 días alternativamente con medio endotelial y de músculo liso (3 días con cada medio). Se preparó el medio endotelial completo usando medio basal MCDB131 (10372, Life technologies, Suecia) complementado con suero AB humano inactivado con calor al 10% (34005100, Life technologies, Suecia), glutamina al 1% (25030, Lonza, Dinamarca), penicilina-estreptomicina-anfotericina al 1% y el kit EGM2 single quote (CC-4176, Lonza, Dinamarca) que contenía ácido ascórbico, hidrocortisona, transferrina, insulina, VEGF humano recombinante, factor de crecimiento de fibroblastos humano, factor de crecimiento epitelial humano, sulfato de gentamicina y heparina. Se preparó el medio de músculo liso completo usando 500 ml de medio 231 (M231, Life technologies, Suecia) complementado con suero AB humano inactivado con calor al 10%, penicilina-estreptomicina-anfotericina 1% y 20 ml de complemento de crecimiento de músculo liso (SMGS) (S-007-25, Life Technologies, Suecia) y 5 ml de complemento de diferenciación de músculo liso (SMDS) (S-008-5, Life technologies). Para el primer ciclo, se usó medio de músculo liso que contenía sólo SMGS, mientras que en el segundo ciclo se usaron tanto SMGS como SMDS.

Caracterización de venas recelularizadas

Tras 14 días de recelularización se tomaron biopsias de las venas para preparar criobloques y bloques de parafina tal como se explicó anteriormente. Para visualizar la presencia de células endoteliales, se seleccionaron los marcadores CD31 (1:1000) y VWF (1:100) y se tiñeron mediante inmunofluorescencia, mientras que la actina del músculo liso (1:50) se tiñó mediante inmunohistoquímica para visualizar las células del músculo liso. También se sometió a prueba de tensión la vena recelularizada para determinar la resistencia mecánica tal como se explicó anteriormente.

Resultados

Descelularización de venas

65 La descelularización mediante una combinación de agitación y perfusión con Triton al 1% y TNBP al 1% descelularizó satisfactoriamente venas ilíacas en 9 ciclos. La morfología macroscópica de las DV parecía blanca y translúcida, pero no se encontraron cambios en el tamaño ni fugas (figura 7). Se realizó el análisis histológico

mediante tinciones de HE, MT y VVG. En todas las DV no se observó tinción de núcleos (tinción de HE-azul y MT-negra) tras 9 ciclos (figuras 8, 9 y 10).

Matriz extracelular presente en venas descelularizadas

La tinción de MT mostró la presencia de una abundante cantidad de colágeno (color azul, figura 3) tras la descelularización. La tinción de VVE proporciona color negro a elastina y núcleos y rojo a colágeno (figura 10). A partir de la tinción de VVE, se observó la presencia del anillo de elastina incluso tras la descelularización. La tinción de inmunohistoquímica para las proteínas de la MEC principales laminina, fibronectina, colágeno IV y colágeno I en DV también mostró la conservación de importantes proteínas de la MEC (figuras 11 y 12). La cuantificación de colágeno y GAG con los ensayos de sircol y biglycan respectivamente también mostró que no había pérdida significativa de colágeno y GAG tras la descelularización (figura 13). El protocolo de descelularización también condujo a una disminución en la cantidad de ADN desde 193 ± 8 ng/mg de tejido en venas normales hasta 15 ± 8 ng/mg en venas descelularizadas (figura 13). De los 17 factores de crecimiento angiogénicos sometidos a prueba a través de luminex, factores de crecimiento leptina y EGF, había 13 factores de crecimiento que estaban todavía presentes en la DV (figura 14). Aunque los factores de crecimiento conservados en la DV eran menos y la disminución en veces era de 7-9 veces. Los factores de crecimiento no detectados en las venas descelularizadas estaban presentes en menores cantidades en venas normales. Todos estos resultados mostraron que esta MEC descelularizada puede ser un almacén adecuado para la recelularización.

Recelularización de venas

Con el sistema de biorreactor, se recelularizaron 5 venas de entre 7-9 cm de longitud con sangre durante 2 días y medios endotelial y de músculo liso alternos durante 12 días, 3 días con cada medio. La morfología macroscópica de las venas tras la recelularización parecía rosada con una buena túnica externa. Las venas funcionaban convincentemente con el biorreactor. La tinción de histología con HE mostró la presencia de muchos núcleos en las capas interna, media y externa de la vena. La tinción de MT también confirmó la presencia de núcleos tenidos de negro y citoplasma en rojo y la unión de células a colágeno en azul (figuras 15, 16 y 17).

Caracterización de venas recelularizadas

La tinción por inmunofluorescencia con un marcador de células endoteliales VWF mostró un color verde continuo y un aspecto punteado de color verde con anticuerpo frente a CD31 confirmó la presencia de células endoteliales hacia el revestimiento interior de la vena (figura 18). La tinción por inmunohistoquímica con actina del músculo liso también confirmó la presencia de células de músculo liso con forma de huso sobre todas las capas media y externa de la vena (figura 19). Las células de músculo liso se distribuyen en toda la vena y la presencia de anillos delgados de células de músculo liso justo por debajo del revestimiento endotelial. No se obtuvieron resultados similares cuando la descelularización se llevó a cabo con desoxicolato de sodio (figuras 20, 21 y 22).

Pruebas de tracción

La resistencia a la tracción de la vena descelularizada en comparación con la normal mostró una disminución en la fuerza requerida para la rotura y la longitud de elongación antes de la rotura indicando que la vena descelularizada puede soportar menos cantidad de presión en comparación con la normal. Ambas de estas propiedades se recuperaron y están próximas a las normales tras la recelularización (figura 23).

Discusión

Estos experimentos demostraron el cultivo tridimensional *ex vivo* de venas usando sangre completa. Se cree que esta tecnología para el procedimiento y la preparación de injertos es segura para su uso clínico en pacientes con enfermedades vasculares. El sistema de biorreactor preparado de manera interna ayudó en el crecimiento tisular y debido a la leve presión de perfusión la vena dentro del reactor puede mantenerse inflada de modo que toda el área de superficie queda expuesta a los nutrientes. La descelularización de venas iliacas con TNBP y triton también produjo un almacén con resistencia y componentes de la MEC conservados. Sin embargo, el número de ciclos requeridos para descelularizar una vena varía de donante a donante y de ubicación a ubicación dentro del tejido. En estos experimentos se usaron venas iliacas comunes, externas e internas. La vena iliaca común tardó 9 ciclos y las venas iliacas externas e internas se descelularizaron tras 7 ciclos. Se requería monitorización continua tras 6-7 ciclos de perfusión y el procedimiento de descelularización puede detenerse tan pronto como estén ausentes núcleos.

La perfusión del sistema de biorreactor completo con heparina antes de la recelularización impide la formación de coágulos de sangre en venas, tuberías circulante y de la manera más importante también activa FGF que tienen una función pleiotrópica y estimulan el crecimiento de células endoteliales, células del músculo liso, fibroblastos, etc. Tal como se analiza mediante luminex están presentes de manera abundante FGF incluso tras la descelularización. Por motivos desconocidos, está presente VEGF más en tejido descelularizado en comparación con el normal, pero es muy ventajoso. VEGF es un posible mitógeno para células endoteliales vasculares. Se cree que los factores de

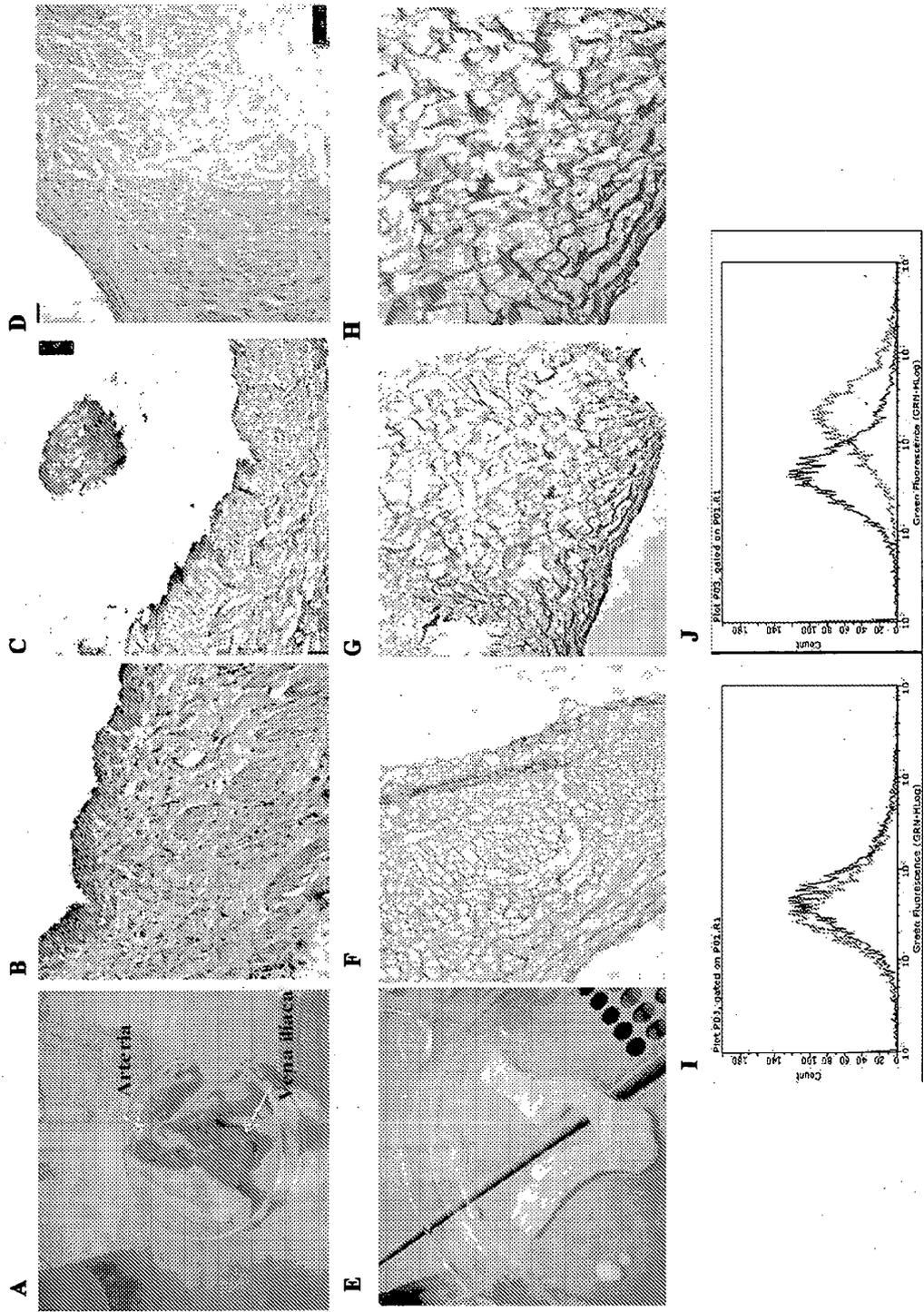
5 crecimiento tisulares residuales todavía presentes tras la descelularización y las proteínas de la MEC fibronectina, colágeno, elastina y laminina desempeñan un papel importante y potencian la unión y el crecimiento de estas células en el tejido. Se encontró que la perfusión con medios de células endoteliales y de músculo liso alternos dos veces durante 3 días con cada medio era suficiente para repoblar la capa de endotelio mediante la presencia de capas de VWF y CD31 continuas. Además, la presencia de actina del músculo liso en el tejido implicaba que la vena tiene la misma elasticidad y ayuda en los movimientos de contracción y expansión empujando la sangre hacia el corazón. Este procedimiento puede usarse para un receptor de cualquier edad.

10

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* de recelularización de un vaso sanguíneo que comprende introducir células endoteliales y células del músculo liso y/o células progenitoras para células endoteliales y del músculo liso en la luz de un vaso sanguíneo descelularizado y cultivar dicha población de células sobre el vaso sanguíneo descelularizado, recelularizando de ese modo el vaso sanguíneo, en el que dichas células endoteliales y células del músculo liso y/o células progenitoras para células endoteliales y del músculo liso se introducen como sangre completa.
2. Método para preparar un injerto de vaso sanguíneo para un sujeto que comprende
- a. administrar células endoteliales y células del músculo liso derivadas del sujeto y/o células progenitoras para células endoteliales y del músculo liso a la luz de un vaso sanguíneo descelularizado; y
- b. cultivar dichas células endoteliales y células del músculo liso derivadas del sujeto y/o células progenitoras para células endoteliales y del músculo liso sobre el vaso sanguíneo descelularizado, en el que dichas células endoteliales y células del músculo liso y/o células progenitoras para células endoteliales y del músculo liso se introducen como sangre completa.
3. Método según la reivindicación 2, en el que dicho vaso sanguíneo descelularizado procede de un donante alogénico.
4. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que
- (a) dicha introducción de las células derivadas del sujeto en el vaso sanguíneo descelularizado se realiza mediante inyección o perfusión; o
- (b) dicho cultivo comprende la perfusión de medio de células endoteliales y/o medio de células del músculo liso; o
- (c) dicho cultivo de las células derivadas del sujeto sobre el vaso sanguíneo descelularizado da como resultado la proliferación y/o diferenciación de las células para dar células endoteliales y células del músculo liso; o
- (d) dicho vaso sanguíneo es una vena o arteria.
5. Método según la reivindicación 4(b), en el que dicha perfusión de dicho medio de células endoteliales y dicho medio de células del músculo liso se administra en alternancia.
6. Método según la reivindicación 5, en el que dicha administración en alternancia se repite al menos dos veces.
7. Método según la reivindicación 4(c), en el que dichas células endoteliales revisten el revestimiento interior o la luz del vaso sanguíneo descelularizado y dichas células del músculo liso migran hacia las paredes o están presentes sobre las capas media y externa del vaso sanguíneo descelularizado.
8. Método según las reivindicaciones 1, 2, 4(c) o 7, en el que dichas células endoteliales expresan cadherina VE, AcLDL, vWF o CD31 o en el que dichas células del músculo liso expresan actina o vimentina de músculo liso.

Figura 2



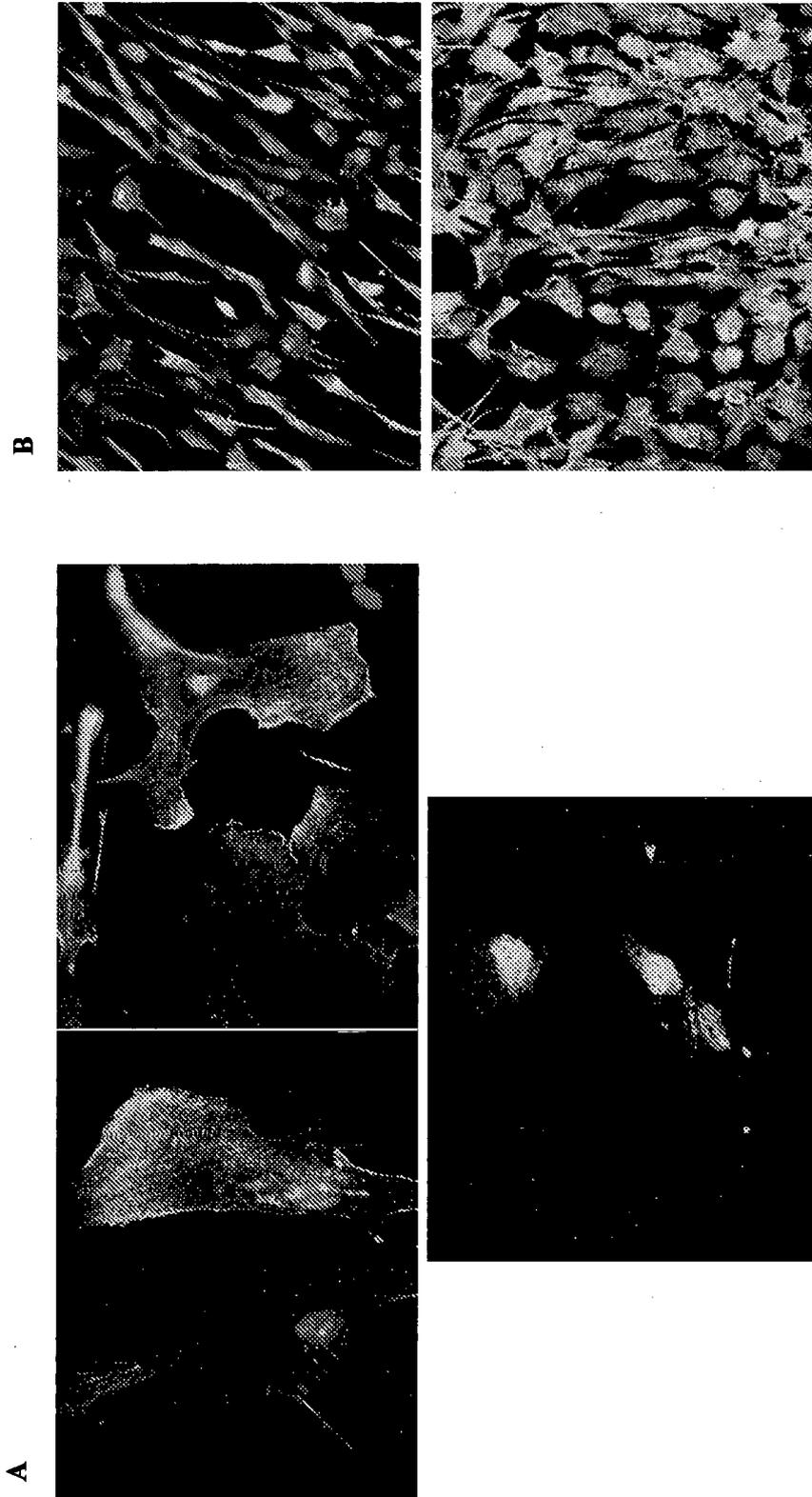
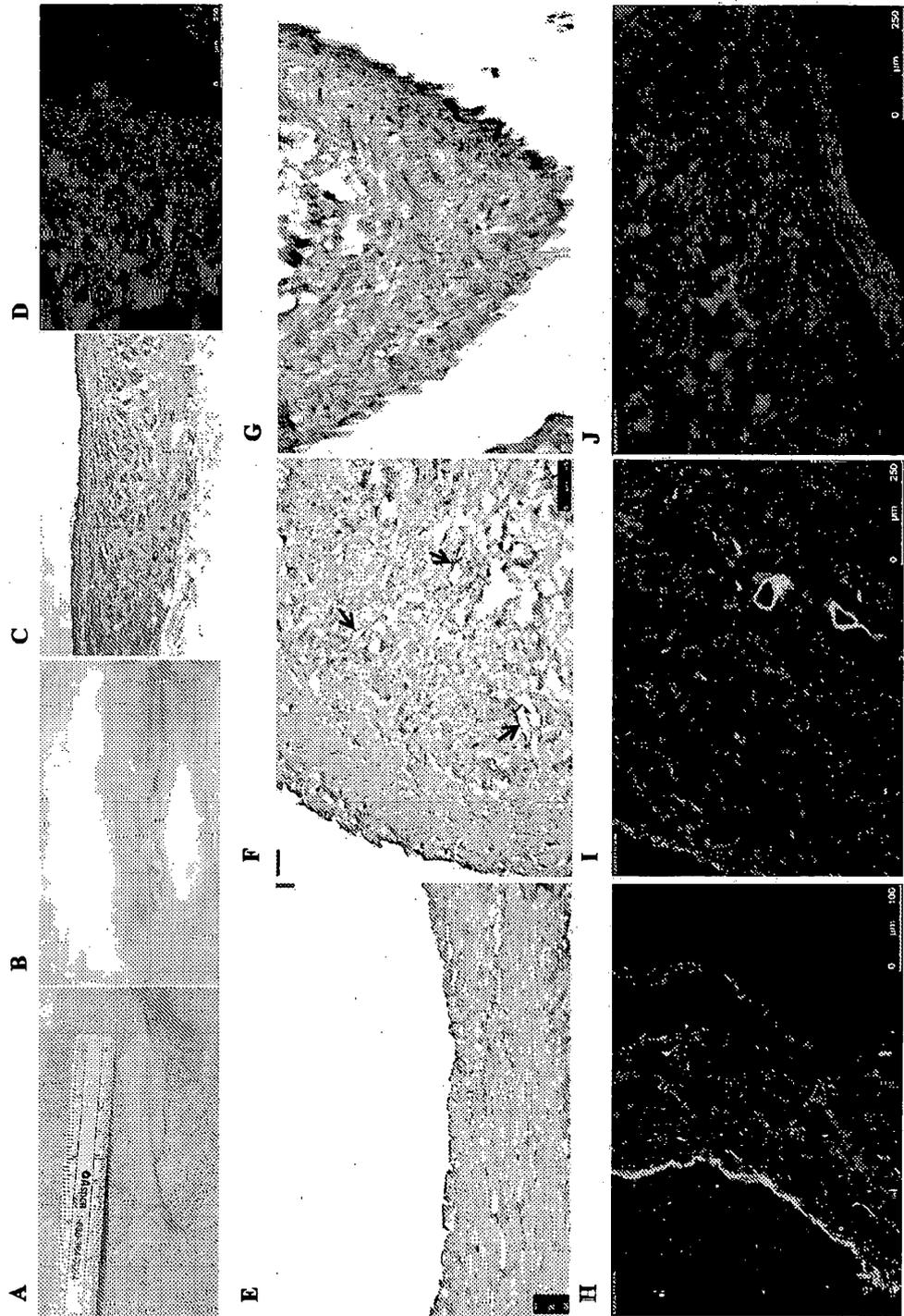
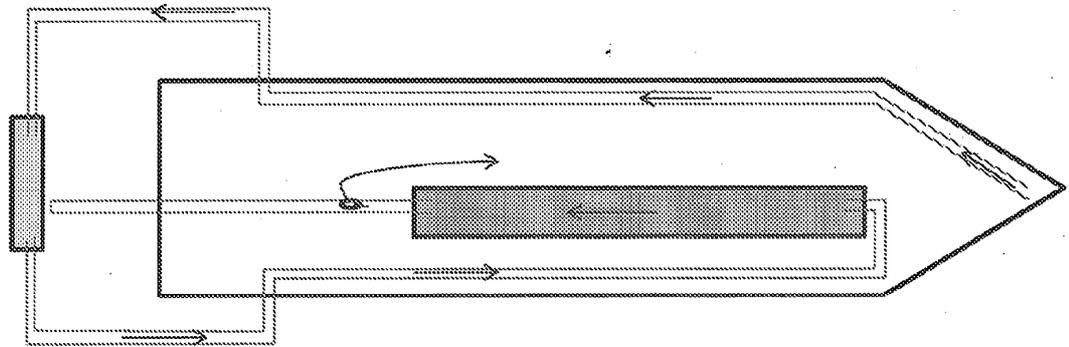


Figura 3

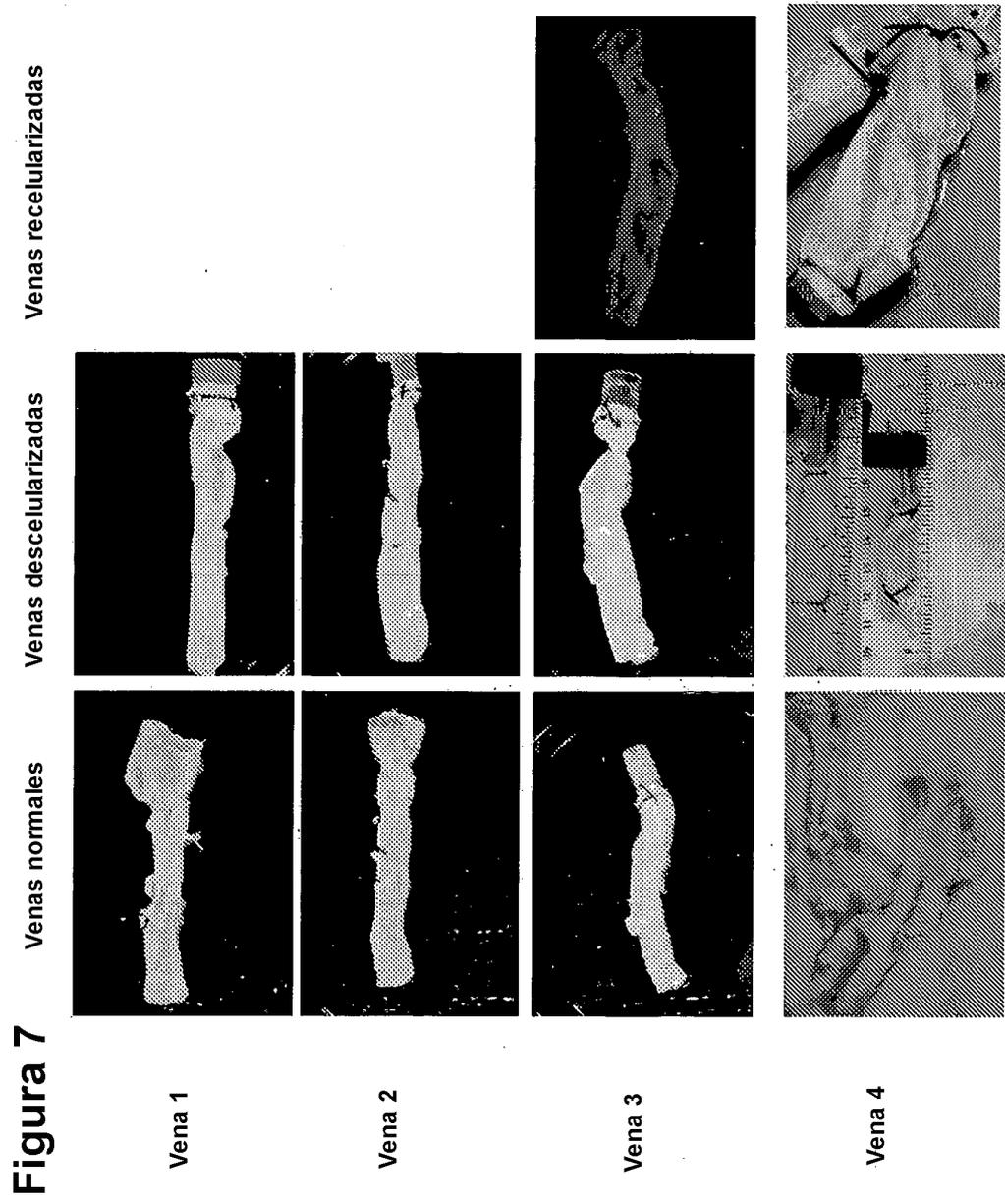
Figura 4

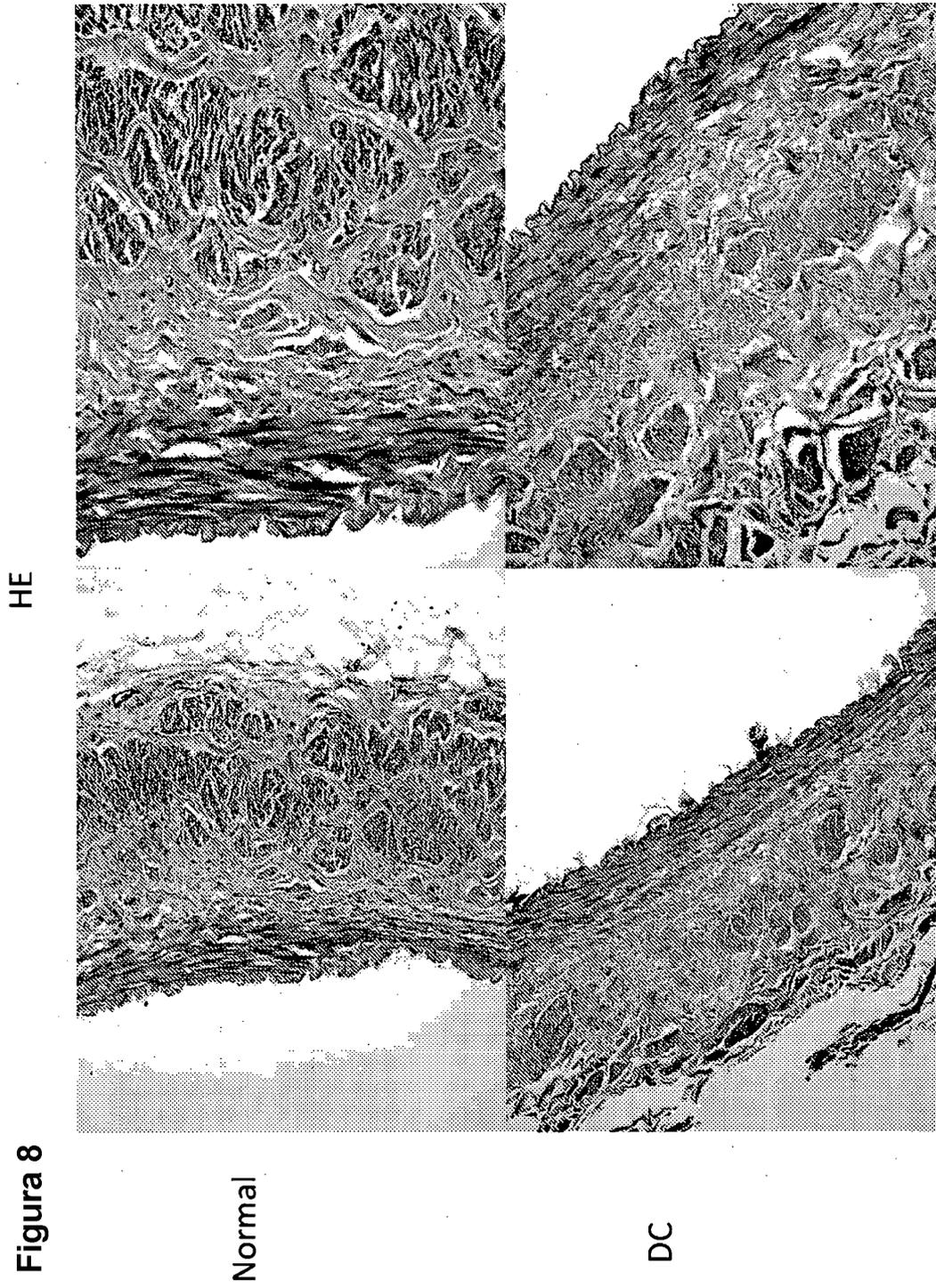




El recuadro azul es el biorreactor. El recuadro rojo es el vaso. El sentido de las flechas indica el flujo de las disoluciones en los tubos.

Figura 6





Tinción tricrómica de Masson

Figura 9

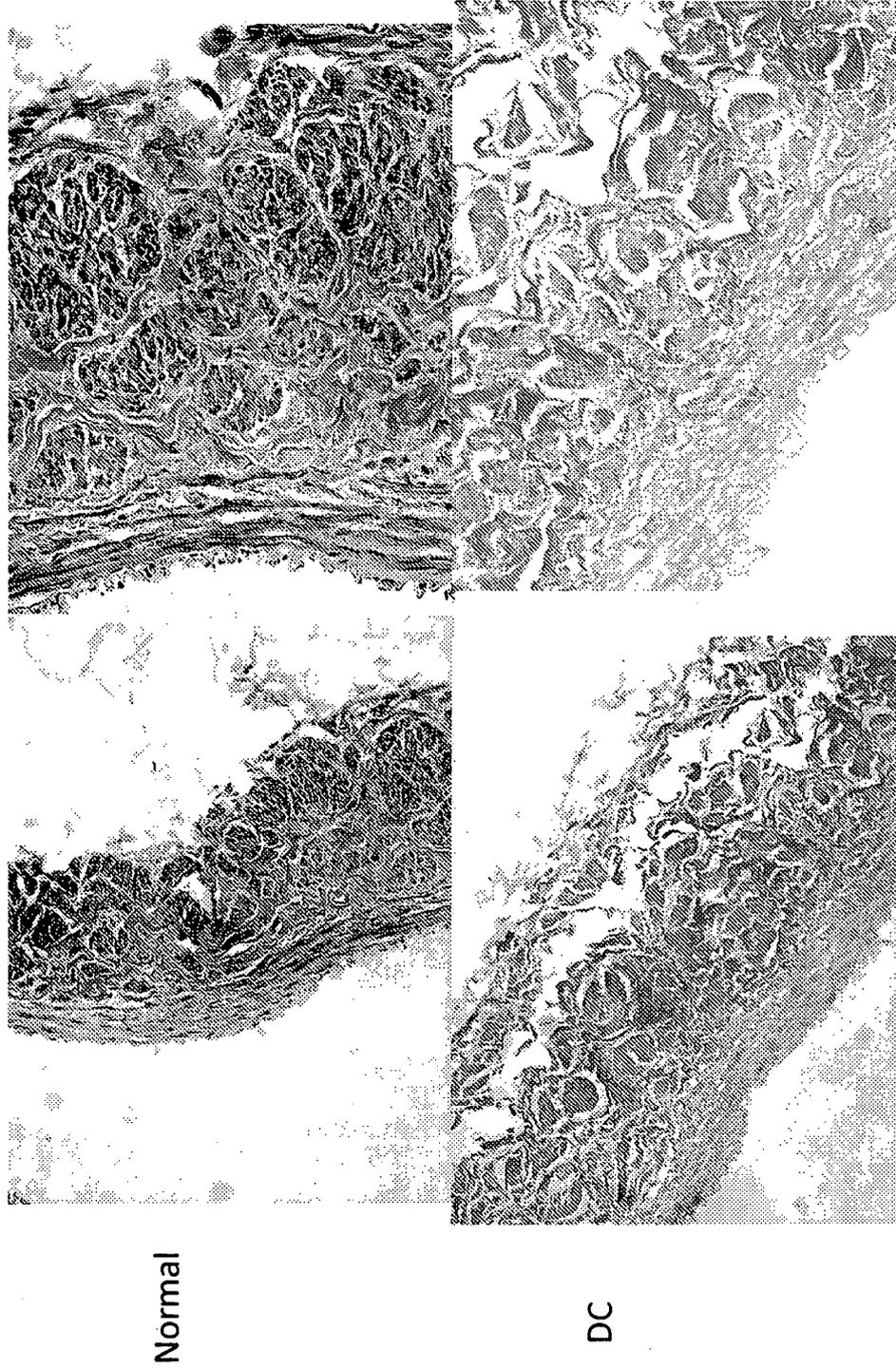
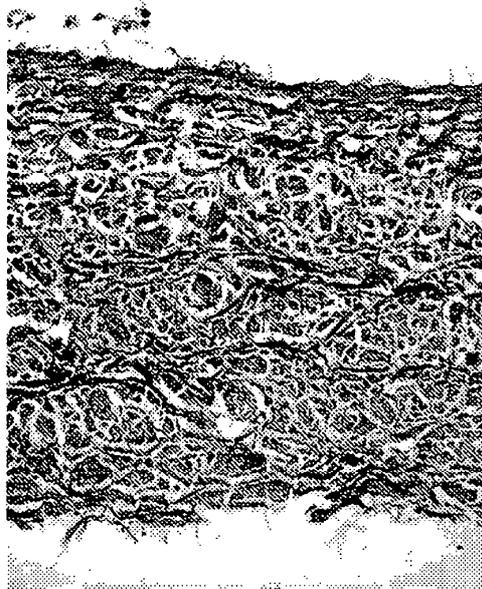
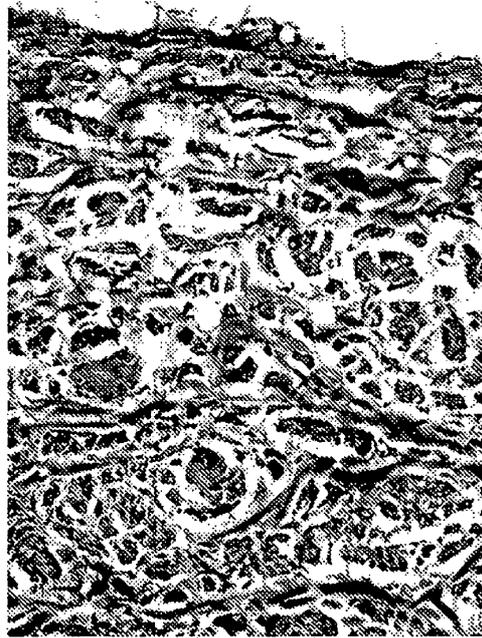
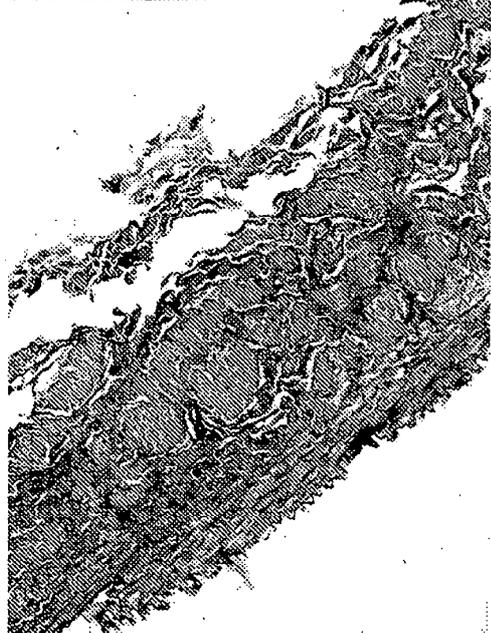
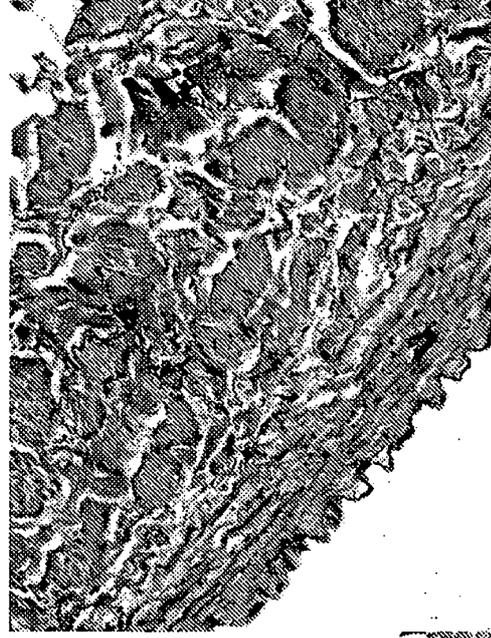


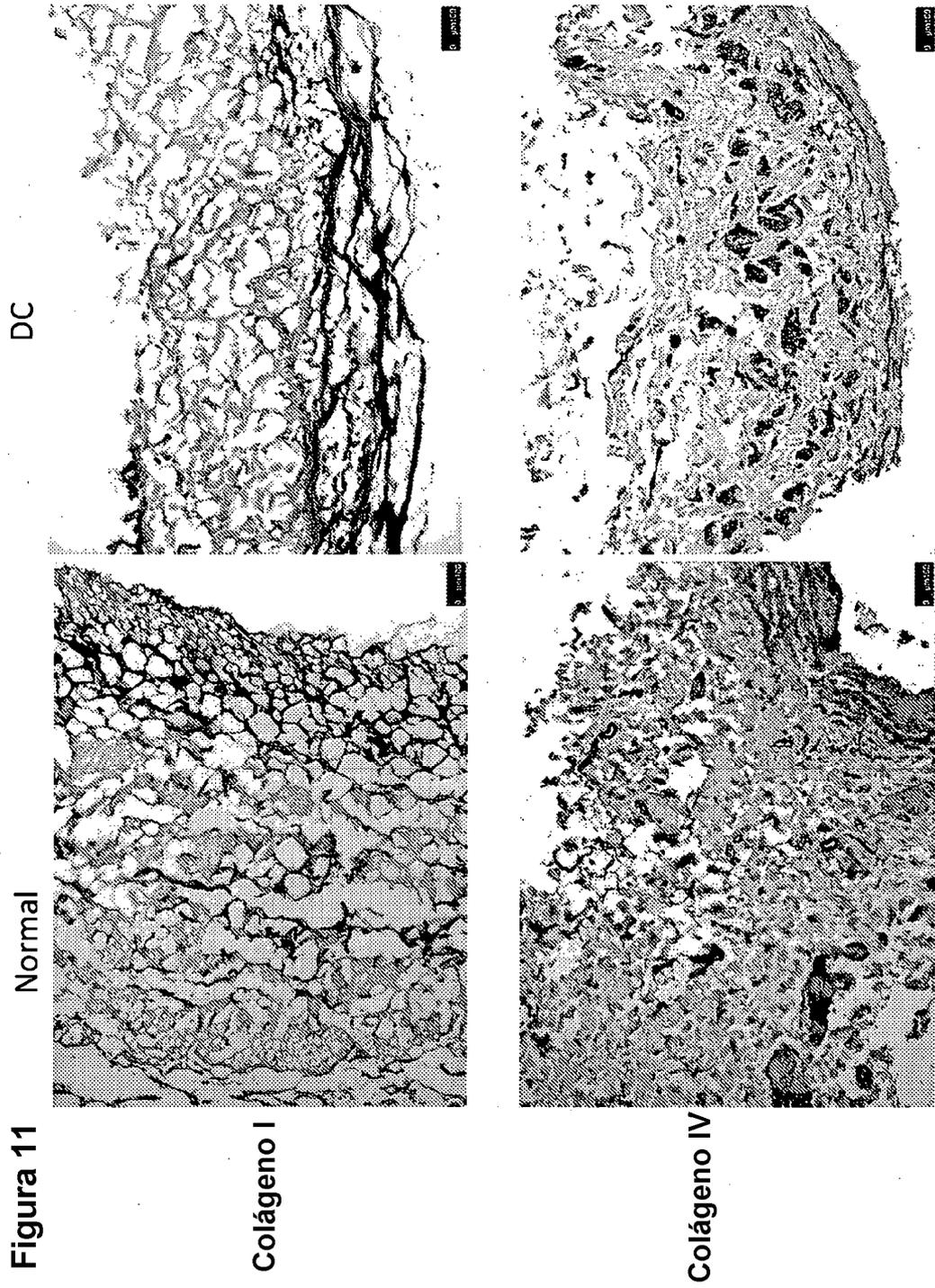
Figura 10 Tinción de Verhoeff Von Gieson



Normal



DC



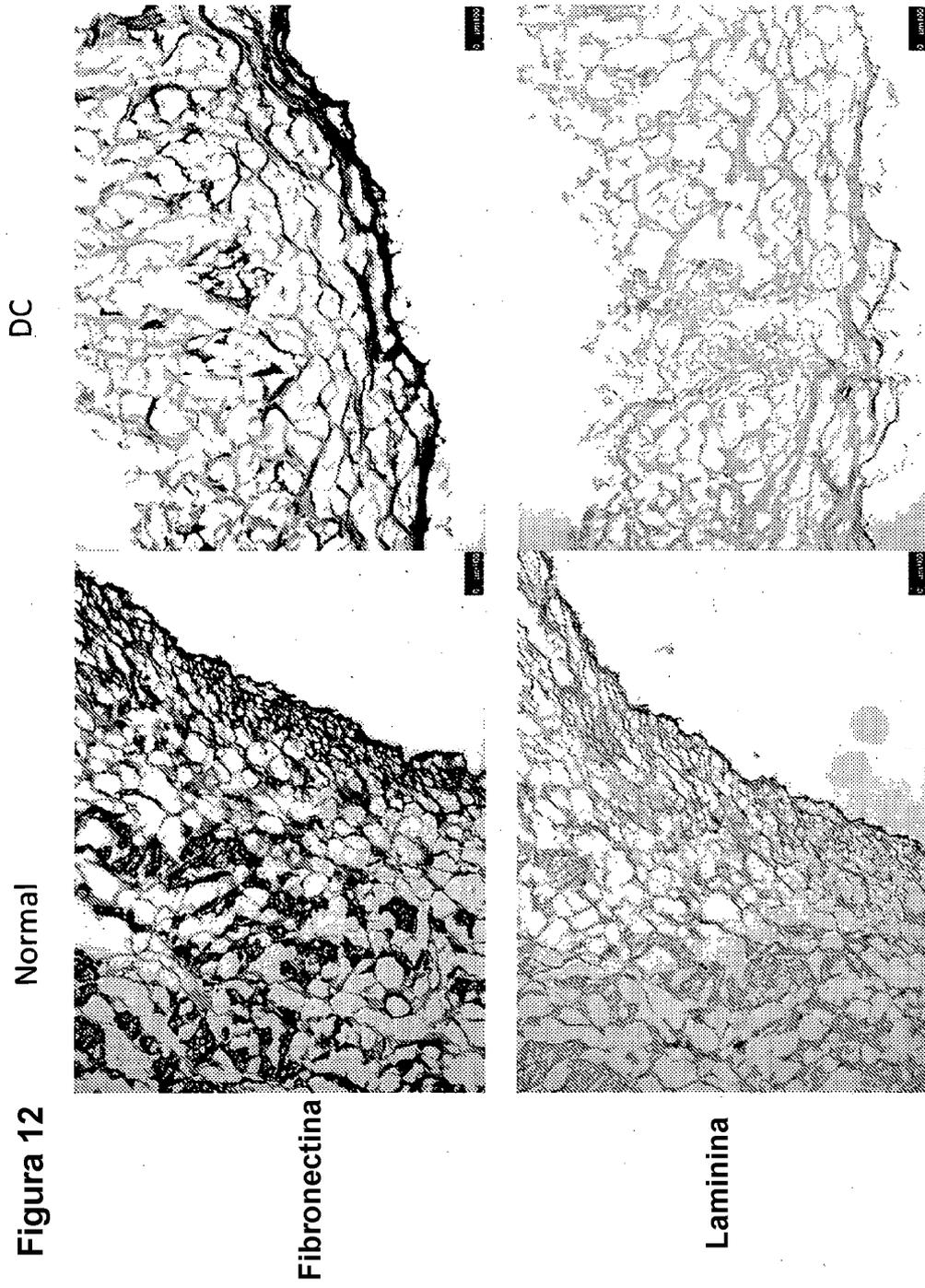
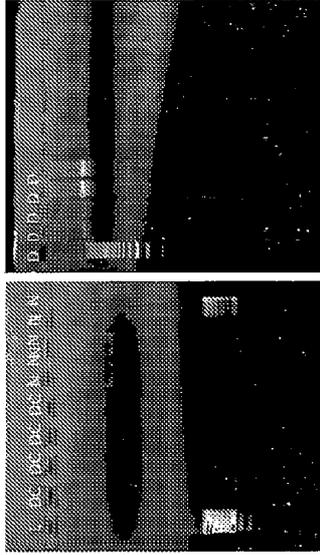


Figura 12

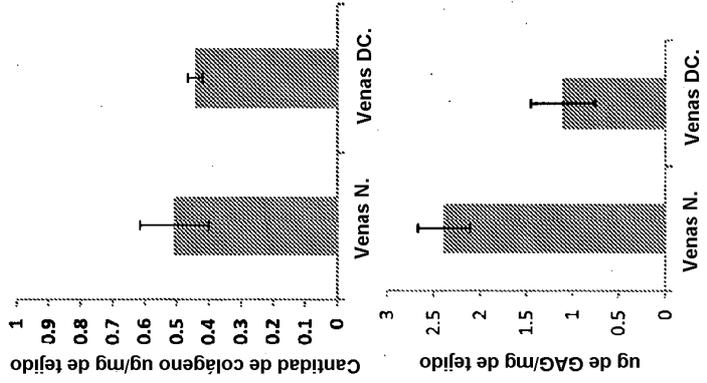
Figura 13

Cuantificación de ADN			
n.ºm Muestra	ADNng/mg	Promedio	
1 Vena H. Normal (Persona 1)	349,4		
2 Vena H. Normal 2 (Persona 2)	161,5		
3 Vena H. Normal 3 (Persona 2)	144,06		
4 Vena H. Normal 4YG	120,44	193,85	
1 11 ciclos en vena H. - TNBP (pers. 1)	3,29		
2 11 ciclos en vena H. - SDC (pers. 1)	-0,49		
3 9 ciclos en vena H. 4YG2 DC gruesa	5,98		
4 9 ciclos en vena H. 4YG2 DC delgada	29,35		
5 9 ciclos en vena H. 1YB DC	39,4	15,506	



Cuantificación de colágeno				
n.ºm Muestra	Conc. ug/mg	Promedios	DE	EE
1 Vena Normal 9/8/12	0,54227778	0,507721634	0,185353685	0,107014
2 Vena Humana Normal 4YG	0,307521739			
3 Vena Humana Normal 4YG2	0,673365385			
1 Vena Humana Descelularizada 21	0,411630824	0,442073536	0,03975952	0,022955
2 Vena Humana Descelularizada 22	0,427533333			
3 12 ciclos en vena H. Descel. SDC	0,487056452			

Cuantificación de GAG				
n.ºm Muestra	GAGs (ug/mg)	Promedio	DE	EE
1 Vena H. N. con válvulas	2,143135593			
2 Vena H. N. 23	2,003486486			
3 Vena H. N. 4YG	1,839797688			
4 Vena H. N. 2	2,370978261			
5 Vena H. N. 4YG2	2,243507463			
6 Vena H. N. oslo	3,720588235	2,386916	0,679012	0,277206
7 Vena H. DC. con válvulas	1,728933054			
8 Vena H. DC. 21	0,596025513			
9 Vena H. DC. 22	0,899723			
10 Vena H. DC. TNBP	2,53835443			
11 Vena H. DC. 4YG2 delgada	0,442720878			
12 3 ciclos ADNasa en vena H. DC.	0,398645116	1,100734	0,858188	0,350354



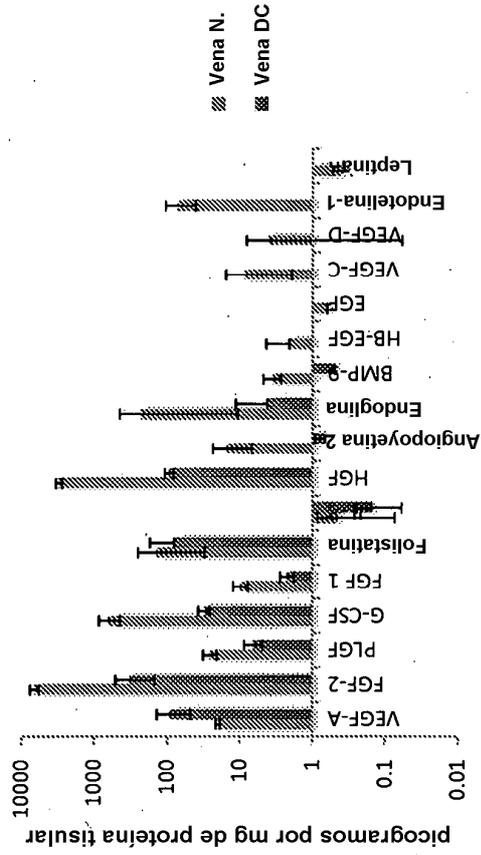


Figura 14

n.º m	Luminex	
	Factor crecim.	Vena N Vena DC
1	VEGF-A	19,9155 92,99248
2	FGF-2	6691,134 331,9665
3	PLGF	26,18524 6,790597
4	G-CSF	649,2366 31,40086
5	FGF 1	10,0411 2,290397
6	Folistatina	142,175 80,22624
7	IL-8	0,462911 0,15407
8	HGF	3088,075 95,13041
9	Angiopoietina 2	15,12961 0,669507
10	Endogлина	233,4429 4,195369
11	BMP-9	3,73737 0,496792
12	VEGF-C	8,62099 1,001203
13	VEGF-D	4,028769
14	HB-EGF	2,084002
15	EGF	0,628308
16	Endotelina 1	73,7502
17	Leptina	0,40848

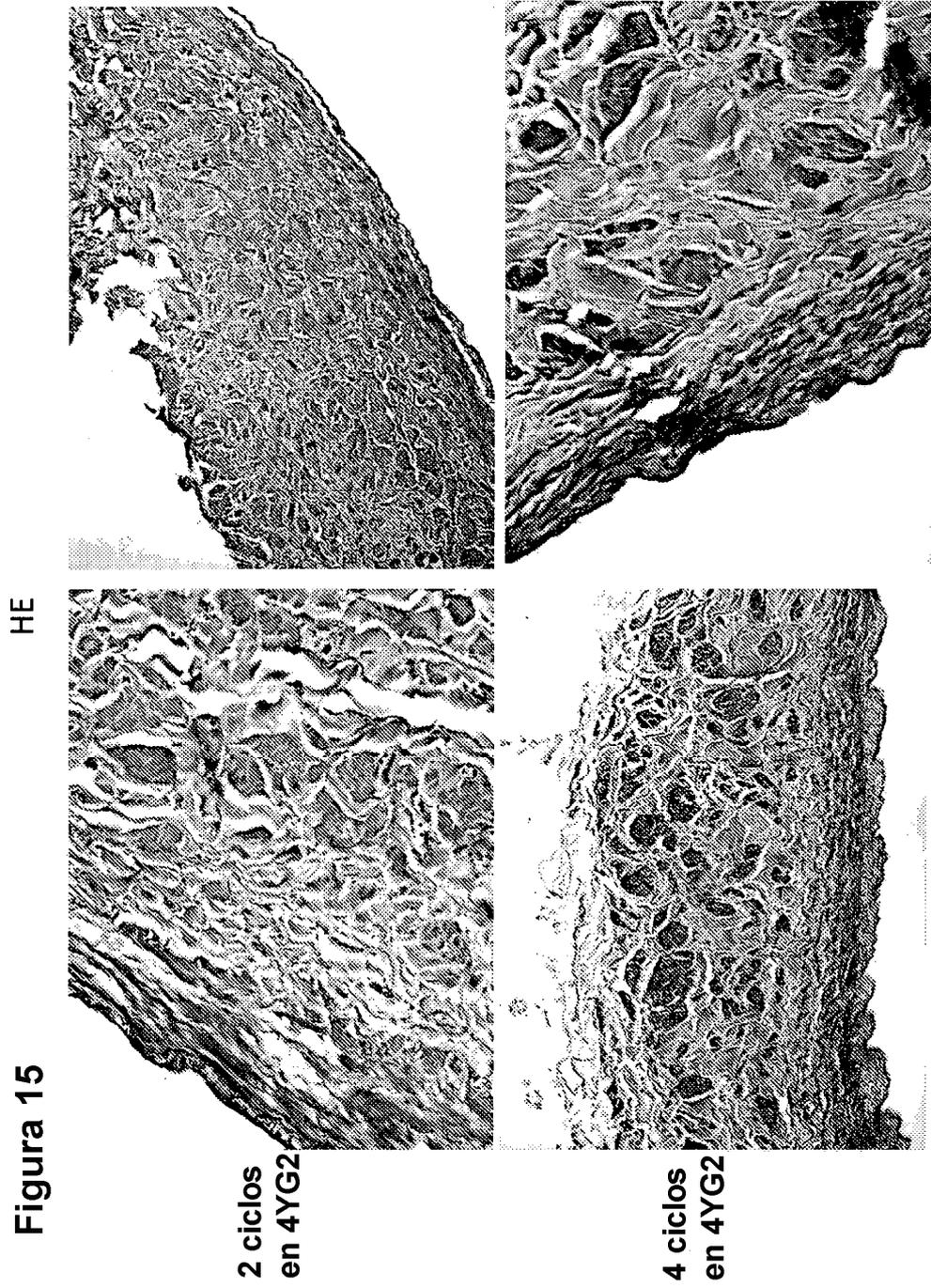


Figura 15

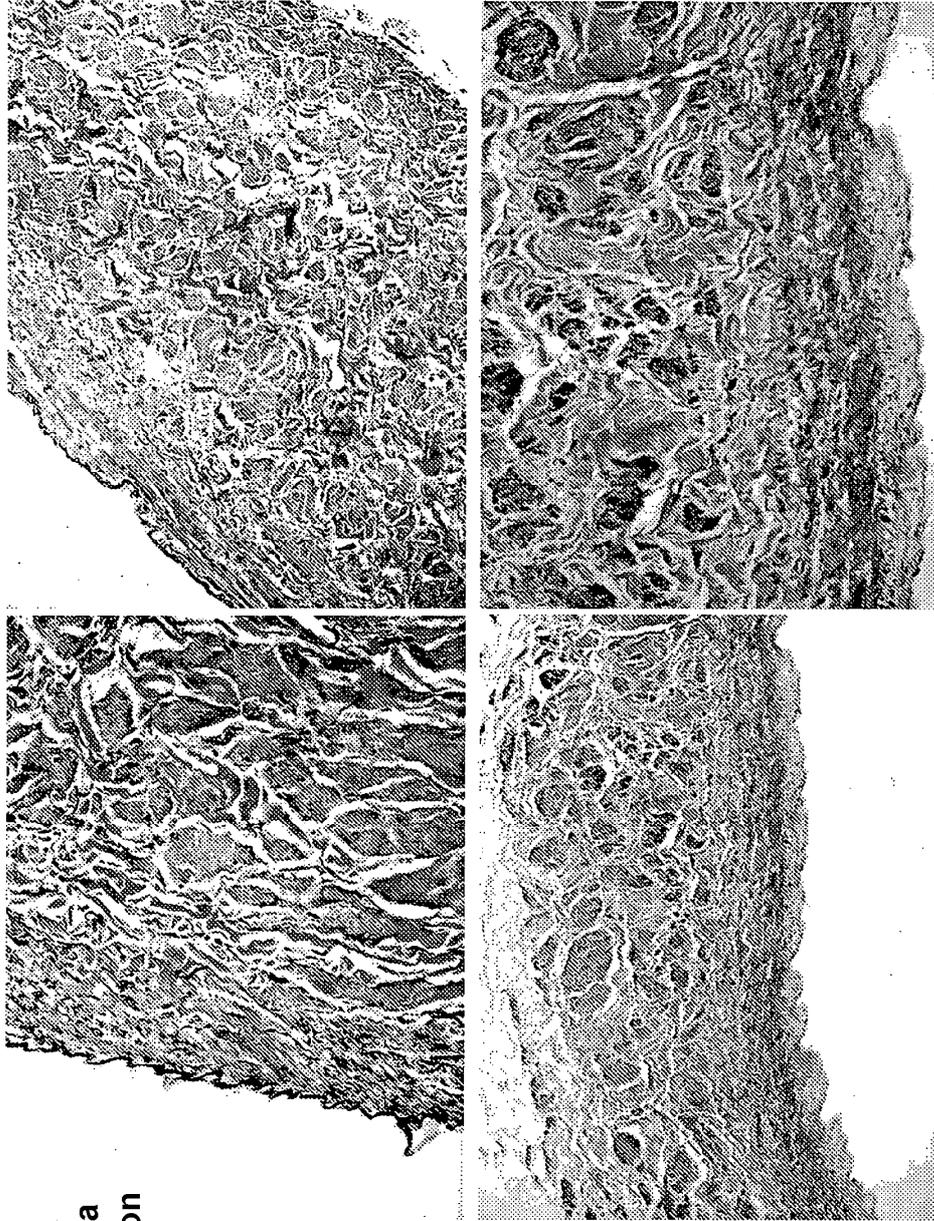
Figura 16

**Tinción
tricrómica
de Masson**

**2 ciclos
en 4YG2**

**4 ciclos
en 4YG2**

Recelularizadas



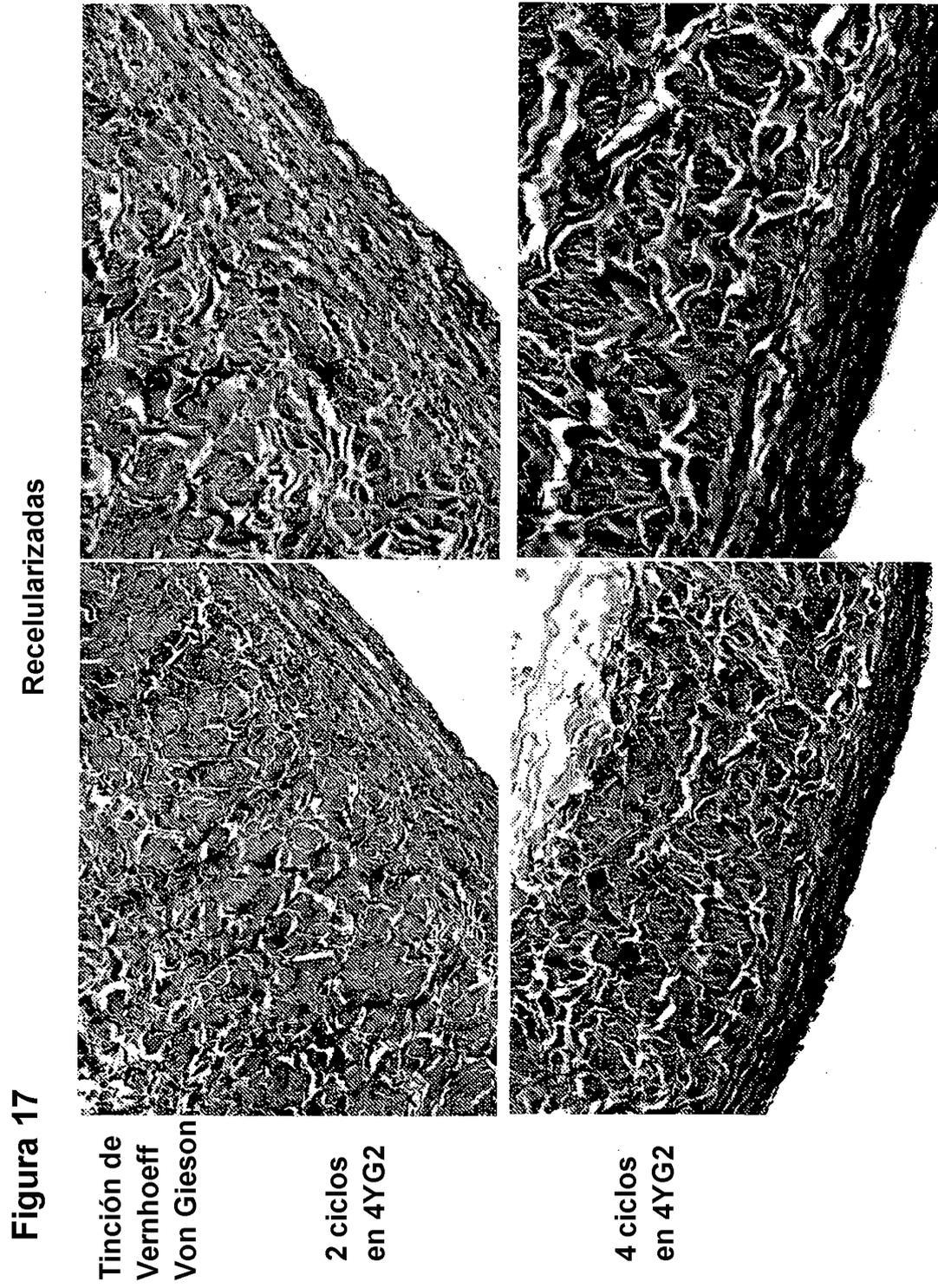
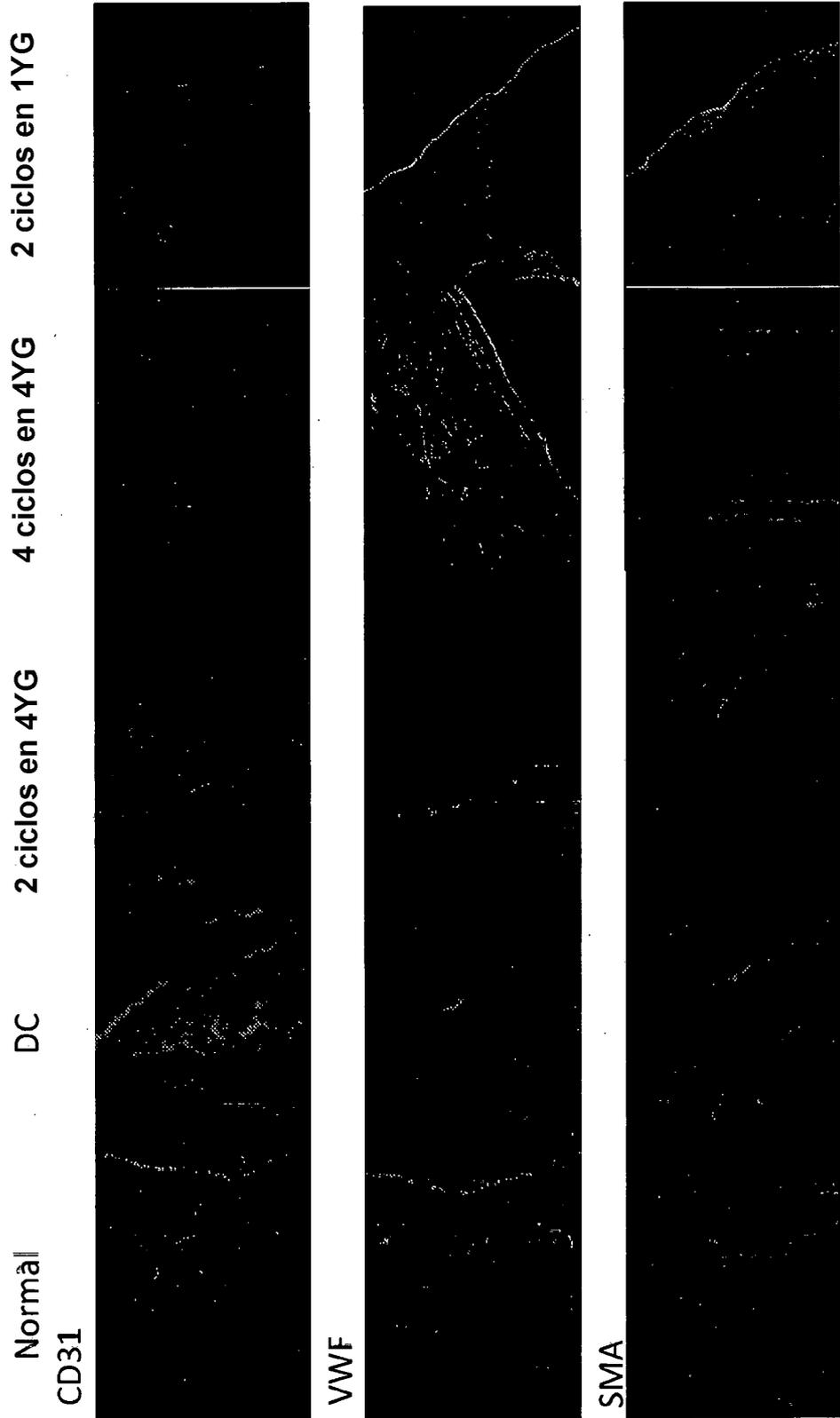
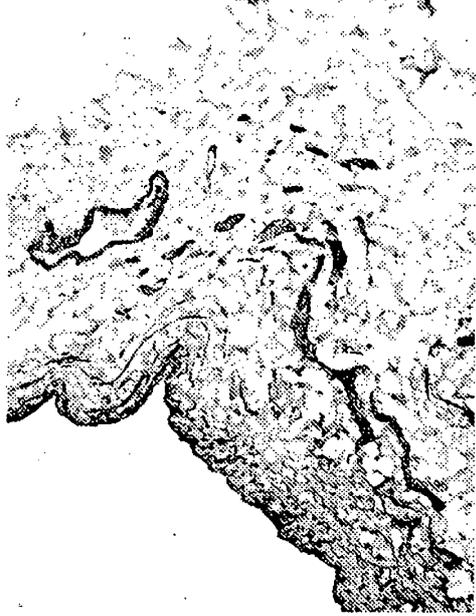
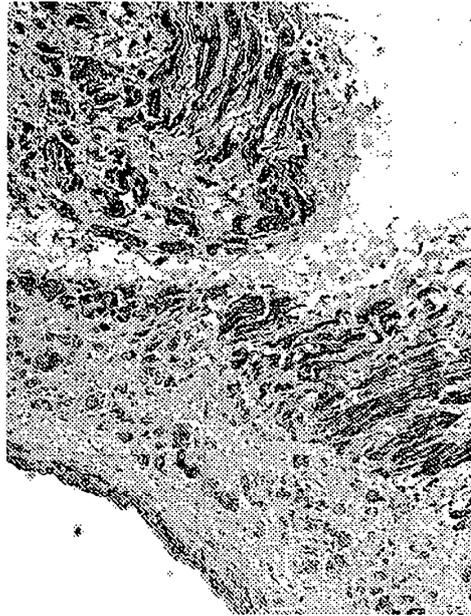
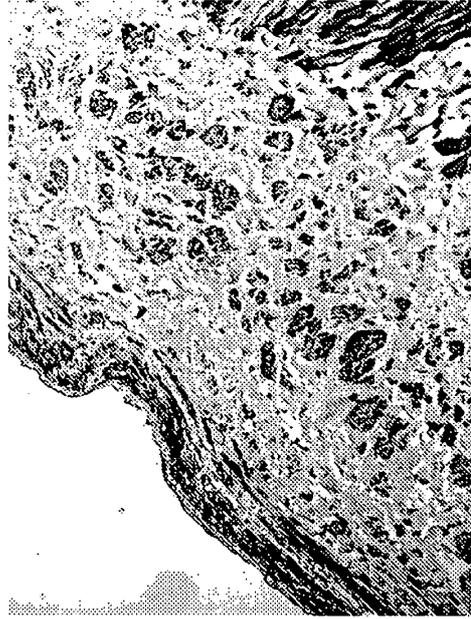


Figura 18



Actina del músculo liso



**4 ciclos
en 4YG**

**2 ciclos
en 1YG**

Figura 19

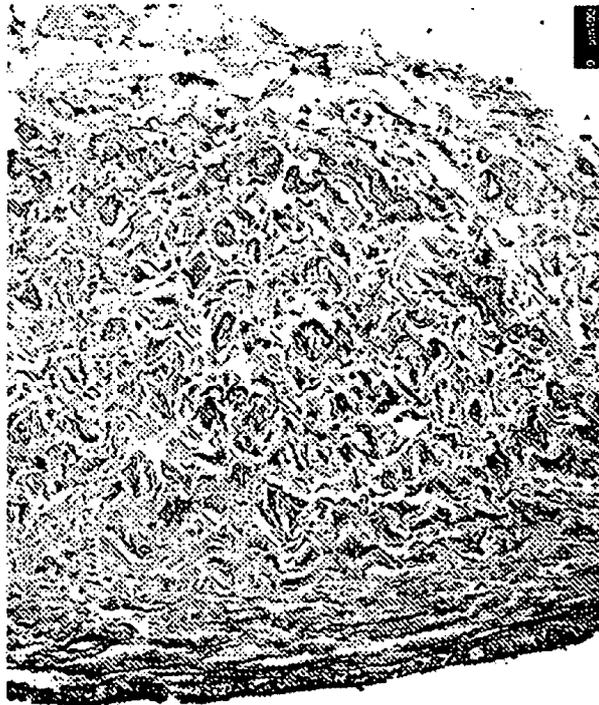
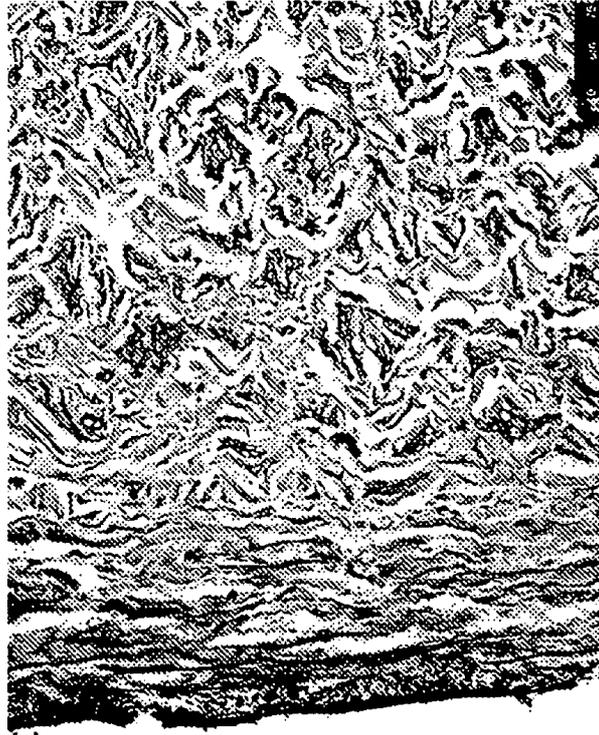


Figura 20

**DCS 10
ciclos
9.7.12**

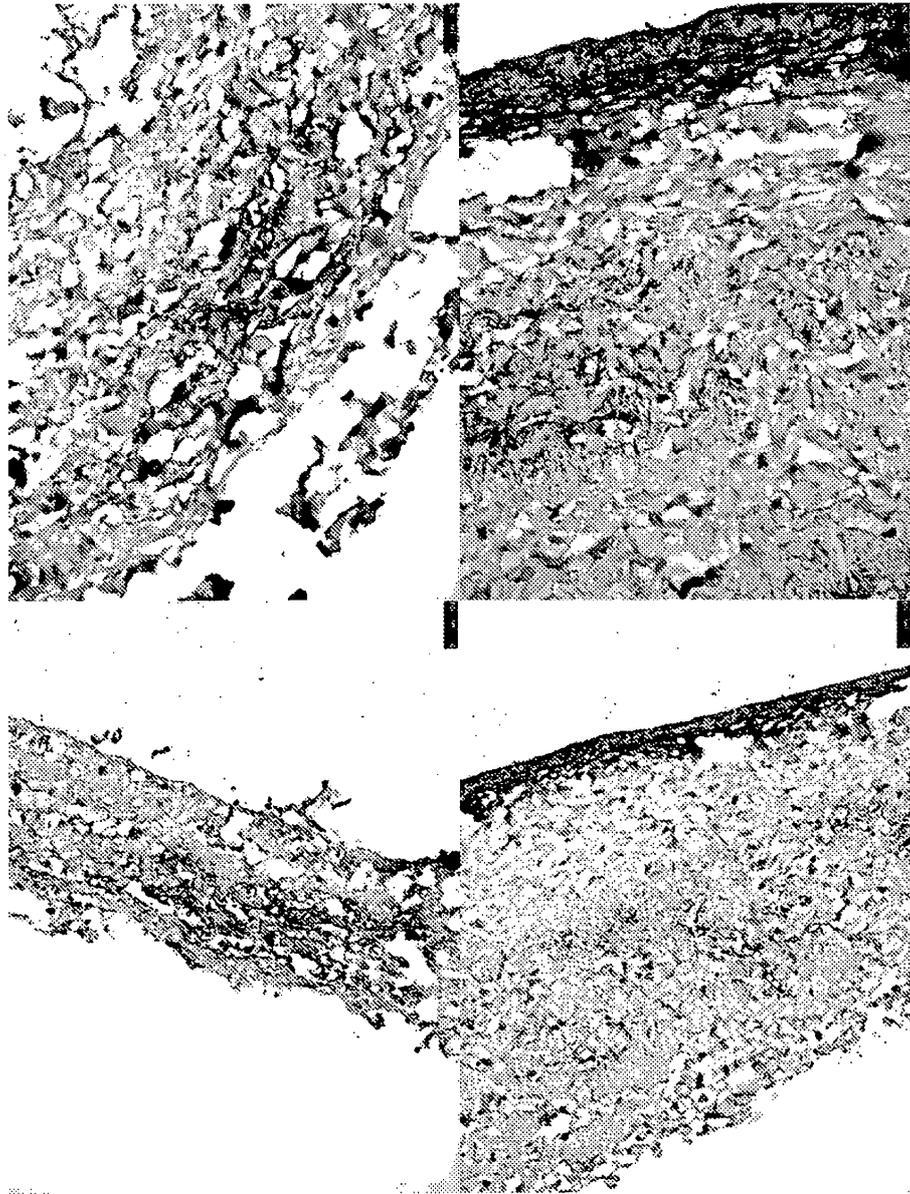


Figura 21

**DCS 10
27.7
2 ciclos**

**DCS 10
9.7
2 ciclos**

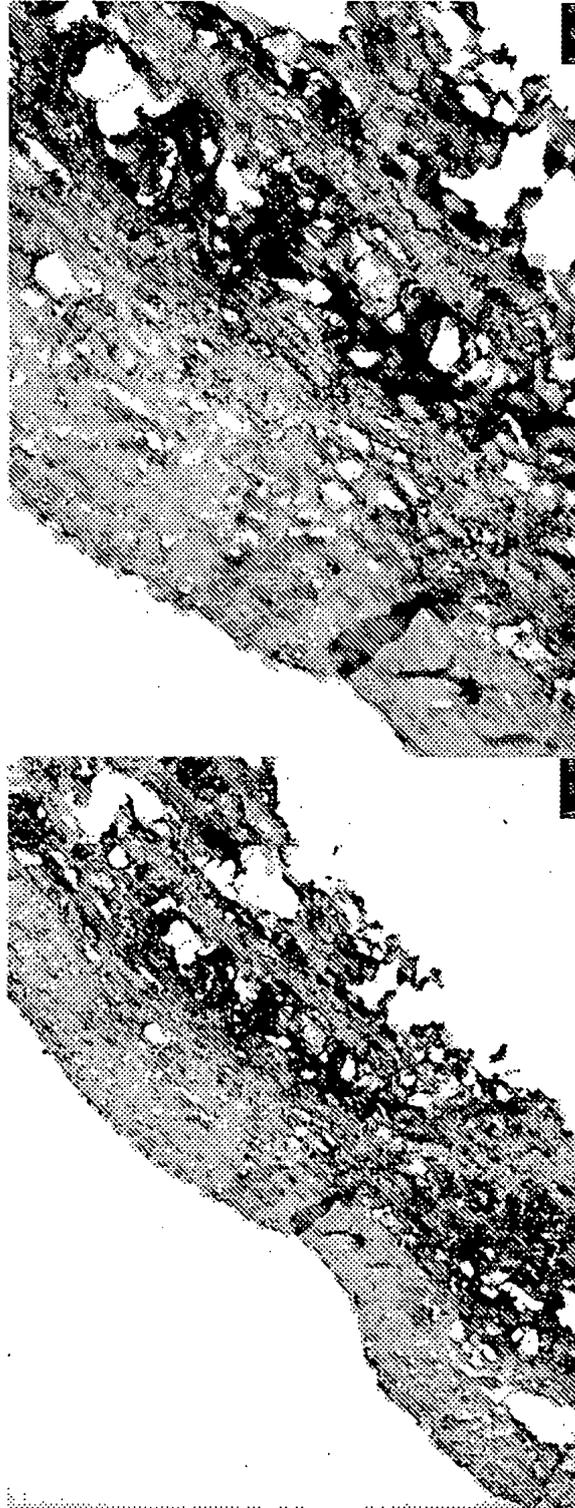


Figura 22

**DCS 12
27.7
2 ciclos**



Figura 23

