

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 031**

51 Int. Cl.:

A61L 27/36	(2006.01)
A61L 27/38	(2006.01)
A61L 27/58	(2006.01)
A61K 38/16	(2006.01)
A61K 38/38	(2006.01)
A61K 38/40	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.10.2006 PCT/US2006/042016**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.05.2007 WO07050902**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2006 E 06817419 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017 EP 1948259**

54 Título: **Matrices de regeneración tisular acelulares bioabsorbibles producidas mediante incubación de productos sanguíneos acelulares**

30 Prioridad:

26.10.2005 US 730614 P

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

01.08.2017

73 Titular/es:

**GENESIS TECHNOLOGIES LIMITED (100.0%)
CGI Tower 2nd Floor, Warrens
St. Michael BB22026, BB**

72 Inventor/es:

AHLFORS, JAN-ERIC, W.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 628 031 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

Matrices de regeneración tisular acelulares bioabsorbibles producidas mediante incubación de productos sanguíneos acelulares

Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

- 5 La presente solicitud está en trámite junto con, comparte al menos un inventor común con y reivindica prioridad para, la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Número 60/730.614, presentada el 26 de octubre de 2005, cuyos contenidos se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

Antecedentes

- 10 La presente invención se refiere a la formulación de una matriz proteinácea bioabsorbible obtenida de tejido animal. La invención también se refiere al uso de esta matriz *in vivo*, la cual funciona para inducir y facilitar el crecimiento y la generación/regeneración de tejido.

- 15 Con la excepción de la sangre, todos los otros tejidos del cuerpo están compuestos de células dispuestas en una estructura integrada que requiere de un armazón de soporte o matriz extracelular para mantener la diferenciación de crecimiento y la función adecuadas. El campo de la ingeniería de tejidos apunta a proporcionar procedimientos para conseguir la estructura compleja utilizando polímeros, ya sea artificiales o naturales, con propiedades que permitan la unión, el crecimiento y la formación de patrones celulares para proporcionar tejidos de reemplazo para los perdidos durante la lesión o la enfermedad. El material de andamiaje ideal sería no inmunogénico e imita la estructura de soporte del armazón natural encontrado en el cuerpo de la forma más estrecha posible. Uno de estos atributos es que el armazón es biodegradable para permitir que el tejido regenerado o reestablecido alcance su nivel definitivo de homeostasis y función. Se sabe en la técnica anterior construir armazones bioabsorbibles que tengan la capacidad de proporcionar una estructura de soporte para las uniones y el crecimiento celular, así como la entrega de productos químicos, proteínas y péptidos biológicamente activos. Los más ampliamente utilizados son hidrogeles que constan de diversos polímeros que incluyen polisacáridos. Los hidrogeles biodegradables producidos a partir de polisacáridos biodegradables, ya sea solos o en combinación con proteínas de la matriz extracelular de origen natural tales como el colágeno, se han empleado como vehículos para la entrega de fármacos (Cascone, M. G. y col., Bioartificial polymeric materials based on polysaccharides, J Biomater. Sci. Polym. Ed. 12, 267-281, 2001; Jeong, B. y col., Drug release from biodegradable injectable thermosensitive hydrogel of PEG-PLGA-PEG triblock copolymers, J Control Release 63, 155-163, 2000; Kopecek, J., Smart and genetically engineered biomaterials and drug delivery systems, Eur. J. Pharm. Sci. 20, 1-16, 2003; Peppas, N. A. y col., Hydrogels in pharmaceutical formulations, Eur. J. Pharm. 50, 27-46, 2000; Zhang, Y., y Chu, C. C., *In vitro* release behavior of insulin from biodegradable hybrid hydrogel networks of polysaccharide and synthetic biodegradable polyester, J. Biomater. Appl. 16, 305-325, 2002) y para proporcionar soporte estructural para tejidos diseñados de forma tecnológica (Arevalo-Silva, C. A. y col., Internal support of tissue-engineered cartilage, Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 126, 1448-1452, 2000; Desgrandchamps, F., Biomaterials in functional reconstruction, Curr. Opin. Urol. 10, 201-206, 2000; Kim, T. K. y col., Experimental model for cartilage tissue engineering to regenerate the zonal organization of articular cartilage, Osteoarthritis Cartilage 11, 653-664, 2003; Kojima, K. y col., A composite tissue-engineered trachea using sheep nasal chondrocyte and epithelial cells, Faseb J. 17, 823-828, 2003; Marler, J. J. y col., Soft-tissue augmentation with injectable alginate and syngeneic fibroblasts, Plast. Reconstr. Surg. 105, 2049-2058, 2000; Saim, A. B. y col., Engineering autogenous cartilage in the shape of a helix using an injectable hydrogel scaffold, Laryngoscope 110, 1694-1697, 2000; Thompson, C. A. y col., Percutaneous transvenous cellular cardiomyoplasty: A novel nonsurgical approach for myocardial cell transplantation, J. Am. Coll. Cardiol. 41, 1964-1971, 2003; Wake, M. C. y col., Dynamics of fibrovascular tissue ingrowth in hydrogel foams, Cell Transplant. 4, 275-279, 1995; Weng, Y. y col., Tissue-engineered composites of bone and cartilage for mandible condylar reconstruction, J. Oral Maxillofac. Surg. 59, 185-190, 2001; Zimmermann, U. y col., Hydrogel-based non-autologous cell and tissue therapy, Biotechniques 29, 564-572, 574, 576, en diversos lugares, 2000). Recientemente, se ha notificado el uso de un armazón de hidrogel como una estructura de conexión que tenga la capacidad de proporcionar canales de orientación para la regeneración del tejido neural para el tratamiento de la lesión de la médula espinal ("LME") (Tsai, E. C. y col., Synthetic hydrogel guidance channels facilitate regeneration of adult rat brainstem motor axons after complete spinal cord transection, J. Neurotrauma. 21, 789-804, 2004). La producción de una matriz extracelular o material de andamiaje a partir de sangre u otro tejido sanguíneo se ha descrito en Vacanti y Vacanti (Material de armazón biológico, Patente de Estados Unidos Número de Publicación 20040137613, presentada el 17 de octubre de 2003). Este material se describe como compuesto, sustancialmente, de células, residuos celulares y restos celulares. Sin embargo, no se notifica que este material posea una funcionalidad biológica que facilite la cicatrización o la regeneración, y además necesita células viables u otras estructuras con propiedades similares de tipo celular (Vacanti, M. P. y col., Identification and initial characterization of spore-like cells in adult mammals, J. Cell Biochem. 80, 455-460, 2001). A pesar de estos logros, existe aún una necesidad de un material de andamiaje no inmunogénico (o de inmunogenicidad reducida) que posea adicionalmente propiedades de unión y de estímulo del crecimiento celular, y sustente o estimule las propiedades regenerativas/reconstituyentes de los tejidos lesionados que rodean al sitio de la herida.

60

Sumario de la invención

La presente invención proporciona matrices de regeneración y procedimientos para su producción en conformidad con las reivindicaciones adjuntas. En determinadas realizaciones, se produce una matriz de regeneración procesando ya sea sangre coagulada o sangre recogida con anticoagulante. En determinadas realizaciones, se produce una matriz de regeneración a partir de una muestra de tejido de la que en primer lugar se han eliminado las células. Una matriz de regeneración puede obtenerse de un tejido del propio sujeto, permitiendo así una aplicación autóloga, o puede ser un tipo de tejido compatible para permitir aplicaciones alogénicas. En determinadas realizaciones se obtiene una matriz de regeneración a partir de tejido xenogénico. Las aplicaciones xenogénicas tienen utilidad en contextos de investigación, pero normalmente no representan una modalidad terapéutica para aplicaciones en seres humanos o veterinarias. En determinadas realizaciones, se produce una matriz de regeneración a partir de sangre, por ejemplo, a partir de la sangre del propio sujeto.

Una matriz de regeneración producida de acuerdo con determinados procedimientos de la presente invención tiene propiedades terapéuticas en el sentido que tiene la capacidad de iniciar, aumentar, sustentar y/o dirigir la regeneración de tejidos en un sitio de daño, pérdida y/o degeneración de tejido, de forma que el tejido circundante regenere el tejido funcional normal. La matriz de regeneración puede administrarse a un sujeto, en el que la matriz de regeneración inicia y/o aumenta la regeneración de tejidos. En determinadas realizaciones, el tejido dañado a regenerar de acuerdo con los procedimientos de la presente invención incluye, pero sin limitación, tejido nervioso, tejido muscular, tejido hepático, tejido cardíaco, tejido pulmonar y/o tejido cutáneo. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la invención proporciona procedimientos para utilizar los componentes regenerativos naturales de la sangre y/o coágulos de sangre, y diseñarlos de forma tecnológica como una matriz de regeneración que pueda entregarse al sitio de una herida en un tiempo apropiado para maximizar la respuesta de regeneración mientras se minimiza la producción de la formación de cicatrices no funcional.

En determinadas realizaciones, una matriz de regeneración tiene propiedades de neuroregeneración que son útiles para tratar afecciones que dan como resultado el daño, la pérdida y/o la degeneración del tejido nervioso. En determinadas realizaciones, el tejido nervioso a regenerar comprende tejido nervioso procedente del sistema nervioso central ("SNC"). En determinadas realizaciones, el tejido del SNC se pierde como resultado de una enfermedad y/o lesión, tal como, por ejemplo, lesión de la médula espinal, cáncer de la médula espinal, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, ictus y/o esclerosis múltiple. La actividad de regeneración de una matriz de regeneración puede potenciarse o complementarse mediante la adición de uno o más agentes terapéuticos que incluyen, pero sin limitación, proteínas, péptidos, fármacos, citocinas, moléculas de la matriz extracelular y/o factores de crecimiento. En determinadas realizaciones, se aumenta uno o más efectos terapéuticos de un agente terapéutico cuando se administra en una matriz de regeneración.

La presente invención proporciona una matriz de regeneración que comprende una estructura bioabsorbible que tiene propiedades regenerativas del tejido. Tal matriz de regeneración puede contener uno o más de: transferrina, seroalbúmina, precursor de seroalbúmina, componente del complemento 3, hemoglobina de cadenas A-D, IgM, IgG1, inhibidor de la medulasina 2, anhidrasa carbónica y/o proteína CA1.

En determinadas realizaciones, se complementa una matriz de regeneración de la presente invención con uno o más agentes terapéuticos que incluyen, pero sin limitación, proteínas, péptidos, fármacos, citocinas, moléculas de la matriz extracelular y factores de crecimiento. En determinadas realizaciones, se aumentan uno o más efectos terapéuticos de un agente terapéutico cuando se administran en una matriz de regeneración. En determinadas realizaciones, una matriz de regeneración se puede sembrar o mezclar con células incluyendo, pero sin limitación, células madre, células progenitoras, células nerviosas y/o células gliales.

La presente invención proporciona una matriz de regeneración de tejidos bioabsorbible para inducir la regeneración de tejido funcional en el sitio de aplicación en un sujeto. En determinadas realizaciones, una matriz de regeneración estimula la autorregeneración de tejido en el sitio de aplicación. En determinadas realizaciones, una matriz de regeneración aumenta la actividad biológica del tejido circundante. En determinadas realizaciones, una matriz de regeneración

está en forma sólida o semisólida. Por ejemplo, una matriz de regeneración puede estar en forma de una matriz tridimensional. En determinadas realizaciones, una matriz de regeneración está en forma de una suspensión.

Breve descripción de los dibujos

Las características anteriores de la invención se entenderán de forma más fácil en referencia a la siguiente descripción detallada, tomada con referencia a los dibujos que la acompañan. En los dibujos, "RMx" (siglas del inglés: *regeneration matrix*, matriz de regeneración) se refiere a una matriz de regeneración.

Las Figuras 1A, 1B y 1C muestran la transdiferenciación de macrófagos en células de tipo endotelial positivas para el factor de Von Willebrand. 2A: macrófagos (tinción clara) y células (+) para el factor de Von Willebrand (tinción oscura) en el sitio de la lesión de la médula espinal y el implante de la matriz de regeneración a las 2 semanas después del implante en un cerdo. La doble tinción se muestra como color negro. Mostrado con un

aumento de 200x. 2B: tinción negra = macrófagos (tinción clara) que expresan el factor de Von Willebrand, mostrado con un aumento de 400x. 2C: los macrófagos que expresan el factor de Von Willebrand están formando un vaso sanguíneo, mostrado con un aumento de 400x.

5 Las Figuras 2A, 2B, 2C y 2D muestran el efecto del tratamiento con matriz de regeneración sobre tejido de médula espinal de rata. A muestra médula espinal de rata sana en ausencia de una matriz de regeneración con los vasos sanguíneos sanos indicados. B muestra médula espinal de rata dañada, en donde es evidente poco tejido del SNC y no están presentes vasos sanguíneos sanos. C muestra la vista de médula espinal de rata dañada tratada con una matriz de regeneración, en donde son evidentes el tejido del SNC sano regenerado y los cortes transversales de los vasos sanguíneos. D es otra vista de tejido de la médula espinal dañada de C, que muestra tejido del SNC regenerado y un corte longitudinal de vasos sanguíneos sanos.

10 La Figura 3 es una fotografía de una matriz de regeneración producida usando sangre no coagulada y la filtración final por 1,2 μm , contenida con el casete de producción de Opticell®.

15 La Figura 4 muestra un corte de parafina de una matriz de regeneración de 3 semanas fabricada a partir de sangre humana completa. La matriz de regeneración no muestra ningún indicio de células intactas o núcleos. La tinción con hematoxilina fue completamente negativa en todos los cortes analizados, pero el material se tiñe de forma más fuerte con eosina. Cuando se utilizan lentes de alta apertura (alta resolución) puede resolverse de forma clara una estructura granulada. Además de la estructura granulada que comprenden la mayoría de las RMx, es posible observar pequeñas regiones de láminas planas que parecen estar compuestas por una estructura más compacta.

20 Las Figuras 5A, 5B, 5C y 5D muestran micrografías electrónicas de barrido de una matriz de regeneración producida utilizando sangre coagulada y una filtración final por 5 μm . A - 200x, B - 1000x, C - 7500x, D - 7500x.

Las Figuras 6A, 6B, 6C y 6D muestran micrografías electrónicas de barrido de una matriz de regeneración producida utilizando sangre coagulada y filtración final por 1,2 μm (21 días). A - 200x, B - 1000x, C - 7500x, D - 7500x.

25 Las Figuras 67A, 7B, 7C y 7D muestran micrografías electrónicas de barrido de una matriz de regeneración producida utilizando sangre no coagulada (utilizando EDTA) y una filtración final por 1,2 μm (21 días). A - 200x, B - 1500x, C - 5000x, D - 10000x.

La Figura 8 muestra una micrografía óptica de una matriz de regeneración producida utilizando sangre no coagulada y una filtración final por 1,2 μm (aumento de 100x).

30 La Figura 9 muestra una microscopía electrónica de transmisión (MET) de una matriz de regeneración de 21 días preparada a partir de una muestra de tejido pasada a través de un filtro de 5 μm . Es evidente en esta MET que las esferas redondeadas observadas en las micrografías electrónicas de barrido (las fig. 5-7) son parte de una estructura o agregado de estas esferas mucho más grande y relativamente homogénea. No existe evidencia de núcleos.

35 La Figura 10 muestra una microscopía electrónica de transmisión de una matriz de regeneración de 8 semanas fabricada a partir de sangre humana completa. La matriz de regeneración se tiñó de forma homogénea y la superficie externa de cada uno de los agregados tenía menos esferas pequeñas sobresaliente que una matriz de regeneración de 3 semanas (véase la Figura 9), y tenía una forma un tanto de panal (el procedimiento de disposición más eficaz para partículas). Muchos nuevos agregados de la matriz de regeneración se formaron a lo largo de cadenas largas de material de matriz de regeneración.

40 La Figura 11 muestra la microscopía electrónica de transmisión de una matriz de regeneración de 8 semanas fabricada a partir de sangre humana completa. La matriz de regeneración se tiñó de forma homogénea y la superficie externa de cada uno de los agregados tenía menos esferas pequeñas sobresalientes que una matriz de regeneración de 3 semanas (véase la Figura 9), y tenía una forma un tanto de panal (el procedimiento de disposición más eficaz para partículas).

45 Las Figuras 12A y 12B muestran el análisis por SDS-PAGE de una matriz de regeneración procedente de 5 lotes distintos. Las proteínas totales en la matriz de regeneración en los días 15 (A) y 21 (B) se tiñeron con azul de Coomassie. Las especies de proteína principales se numeran de 1-6 y se presentan en los respectivos gráficos de densitometría. Los patrones de peso molecular (KDa) se indican en el lado izquierdo de los geles.

50 La Figura 13 muestra el contenido de ARN total (μg) en la matriz de regeneración y el sobrenadante de cultivos de 21 días (filtrados por 5 μm) que se formaron en presencia de α -amanitina (inhibidor de la ARN polimerasa II), afidicolina (inhibidor de la ADN polimerasa) o ciclohexamida (inhibidor de la síntesis de proteínas) frente al control.

55 La Figura 14 muestra el contenido de proteína total en la matriz de regeneración y el sobrenadante de cultivos de 21 días (filtrado por 5 μm) formado en presencia de α -amanitina (inhibidor de la ARN polimerasa II), afidicolina (inhibidor de la ADN polimerasa) o ciclohexamida (inhibidor de la síntesis de proteínas) frente al control.

La Figura 15 muestra el contenido de proteína total en la matriz de regeneración y el sobrenadante de cultivos de 21 días (filtrados por 1 μm) formado en presencia de α -amanitina (inhibidor de la ARN polimerasa II) frente al control.

60 La Figura 16 muestra el contenido de lípidos total en la matriz de regeneración y el sobrenadante de cultivos de 21 días (filtrado por 1 μm) formado en presencia de α -amanitina (inhibidor de la ARN polimerasa II) frente al control.

La Figura 17 muestra una comparación de un PAGE para la matriz y los medios de bandas de proteínas teñidas con coomasie a partir de matrices filtradas por 1 μm a filtradas por 5 μm .

65 La Figura 18 muestra el efecto de las matrices de regeneración (y su sobrenadante asociado, de forma separada) producidas en los medios de procedimiento con distintos complementos, sobre la regulación positiva

de los genes neuronales. A: NT-3, B: NCAM-1, C: GAP-43.

La Figura 19 muestra la regulación positiva en veces de genes provocada por la matriz de regeneración y la matriz de regeneración inactivada por calor sobre células SH-SY5Y. Las células SH-SY5Y se incubaron con matriz de regeneración durante 3 h y después se analizó la expresión génica de GAPDH, NT-3, NT-6, NCAM-1, FGF-9, GDNF, Netrina-1 y GAP-43 utilizando RT-PCR. Una matriz de regeneración lavada en PBS 3 veces tenía una actividad similar a la matriz de regeneración no lavada. Una matriz de regeneración que se había incubado a 60 °C durante 30 min no tenía actividad de regulación positiva de genes.

La Figura 20 muestra la extensión de neuritas de células Neuroscreen® tratadas con una matriz de regeneración. El panel izquierdo muestra un campo representativo de las células Neuroscreen® que crecen en medio basal. El panel derecho muestra un campo representativo de células tratadas con una matriz de regeneración. Los núcleos celulares están teñidos de azul y la tubulina está teñida de verde.

La Figura 21 muestra una comparación de las extensiones de neuritas de células Neuroscreen® cultivadas en presencia o ausencia de la matriz de regeneración. Los resultados se expresan como el porcentaje del índice de extensión de neuritas de las células tratadas con NGF. Los resultados son la media de 4 experimentos independientes realizados por cuadruplicado. Las barras de error muestran la desviación típica de la media. Los valores de las células tratadas y no tratadas con matrices de regeneración son distintos, con valores P para la diferencia por debajo de 0,01 (prueba t).

La Figura 22 muestra una comparación de las extensiones de neuritas de células Neuroscreen® cultivadas en presencia de una matriz de regeneración producida con y sin complementación con factor de crecimiento EGF y bFGF. Los resultados se expresan como el porcentaje del índice de extensión de neuritas de células tratadas con NGF. Los resultados son la media de al menos seis muestras por duplicado. Las barras de error indican la desviación típica de la media. Todos los valores son distintos entre sí, con un valor P por debajo de 0,01 (prueba t).

La Figura 23 muestra las curvas de respuesta a la dosis para NGF de distintas concentraciones de NGF sobre la extensión de neuritas de células Neuroscreen®.

La Figura 24 muestra el aumento en veces (fracción) sobre el control positivo de NGF (fig. 23; NGF 100 ng/ml) en la media de la longitud total de la extensión de neuritas cuando se aplican matrices de regeneración producidas en medio de procedimiento TR-10. Las matrices de regeneración se produjeron a partir de ya sea sangre completa o de la fracción plasmática- plaquetaria-leucocitaria.

La Figura 25 muestra células de la médula espinal embrionaria de rata primarias de control, marcadas para tubulina neuronal (Tuj 1) y la glía (GFAP) seis días después del inicio del cultivo de células en suspensión individual (dos exposiciones para mostrar todos los componentes teñidos). En promedio, el 4,2 % de las células eran positivas para Tuj-1 y el 0,4 % de las células eran positivas para GFAP. Aumento de 100x.

La Figura 26 muestra el efecto de la matriz de regeneración sobre células primarias de médula espinal embrionaria de rata, marcadas para tubulina neuronal (Tuj1) y glía (GFAP), seis días después del inicio del cultivo de células en suspensión individual (dos exposiciones para mostrar todos los componentes teñidos). En promedio, el 55 % de las células fueron positivas para Tuj-1 y el 92 % de las células fueron positivas para GFAP. Las células doble positivas (positivas para Tuj-1 y GFAP) son indicativas de células neuroprogenitoras trifásicas. Aumento de 100x.

Las Figuras 27A, 27B, 27C y 27D muestran la tinción inmunocitoquímica para β -tubulina (A) y F-actina (B) de fibroblastos humanos cultivados durante 5 días sobre una matriz de regeneración (C y D) frente al control (A y B). El medio utilizado en los cultivos de control fue el medio de procedimiento utilizado para producir la matriz de regeneración. Los fibroblastos humanos cultivados en contacto con la matriz de regeneración eran significativamente menos confluentes (y parecían estar experimentando apoptosis) en comparación con los cultivos de control.

La Figura 28 muestra el efecto de la matriz de regeneración sobre la unión de fibroblastos, el área nuclear de fibroblastos y el % de fibroblastos positivos para BrdU en cultivos de 2 días frente al control.

La Figura 29 muestra que el implante de la matriz de regeneración en un modelo de sección medular completa (5 mm) de rata de LME induce el restablecimiento de la función motora. Los resultados del restablecimiento de la función locomotora, según se miden mediante la puntuación BBB, se registraron cada 2 semanas después de la lesión y del implante de la matriz de regeneración. La puntuación de BBB para animales individuales (matriz de regeneración -M y controles -C).

La Figura 30 muestra la incidencia disminuida de la formación de quistes en un modelo de sección medular de lesión de médula espinal de rata para ratas que recibieron un implante de matriz de regeneración. Los animales implantados con matriz de regeneración (n = 19) tenían una tasa de incidencia del 15,8 % de formación de quistes en y alrededor del sitio de la LME, mientras que los animales de control (n = 5) tenían una tasa de incidencia del 60 % de formación de quistes alrededor del sitio de la LME.

La Figura 31 muestra que el implante de la matriz de regeneración en un modelo de hemisección (5 mm) de LME de rata induce el restablecimiento de la función motora. Los resultados de restablecimiento de la función locomotora, según se midieron mediante las puntuaciones de BBB, se registraron cada 2 semanas después de la lesión y del implante de la matriz de regeneración. Puntuación de BBB para animales individuales que recibieron un implante de matriz de regeneración. Los controles no implantados no sobrevivieron al primer punto de evaluación.

Figura 32A: restablecimiento funcional después del implante de la matriz de regeneración en médula espinal de ratas que tenían una sección completa de 5 mm. Figura 32B: restablecimiento funcional después del implante de una matriz de regeneración en la médula espinal de ratas, 2 semanas después de la lesión por contusión

(50 mm). Las ratas de control vacías no se sometieron a una segunda cirugía a las 2 semanas después de la contusión.

Figura 32C: modelo de combinación (sección completa y contusión) que indica la eficacia de una matriz de regeneración en el tratamiento de la lesión de la médula espinal. Los animales de control incluyen controles vacíos y controles de matriz de regeneración biológicamente inactivada procedentes de ambos modelos de lesión. Para cada una de las Figuras 32A, 32B y 32C, la línea de la parte superior representa los datos procedentes de los animales implantados con matriz de regeneración, mientras que la línea inferior representa los datos procedentes de los animales de control.

La Figura 33 muestra que el implante de la matriz de regeneración induce el restablecimiento de la función motora en lesiones de médula espinal de cerdo provocadas por impacto y/o hemisección quirúrgica (incluyendo la extracción de 5 mm de médula espinal). Los cerdos 00-6-5 y 113-1 recibieron graves lesiones por impacto dando como resultado el desgarro y pérdida de tejido de la médula espinal. El cerdo 80-1 recibió lesión por penetración mediante una aguja de calibre 14. Los cerdos 55-1, 53-2, 54-5 y 54-2, así como todos los cerdos de control, recibieron una hemisección quirúrgica del lado derecho (5 mm de longitud del lado derecho de la médula espinal extirpados). Los resultados del restablecimiento de la función motora según se miden midieron mediante las puntuaciones ASIA numéricas modificadas se registraron cada semana después de la lesión y del implante de matriz de regeneración.

La Figura 34 muestra una comparación de los pesos medios y de las ganancias de peso medias durante 7 semanas en cerdos implantados con la matriz de regeneración o con coágulos de sangre homogeneizados.

La Figura 35 muestra una comparación de los restablecimientos de las capacidades motoras del lado izquierdo durante 7 semanas en cerdos implantados con matriz de regeneración o coágulos de sangre humana tras las lesiones de la médula espinal por hemisección (5 mm de longitud del lado derecho de la médula espinal extraídos) del lado derecho.

La Figura 36 muestra una comparación del restablecimiento locomotor en cerdos tratados con matriz de regeneración humana o coágulo de sangre a las 7 semanas después de la LME. El lado izquierdo lesionado (sirvió como un control interno) fue el mismo en ambos grupos, mientras que el lado derecho lesionado se restableció significativamente más ($p = 0,03$) con la matriz de regeneración que con el coágulo de sangre.

La Figura 37 muestra neuronas de reciente formación (marrones) en el sitio de la lesión de la médula espinal (y extracción de la médula espinal) en un cerdo al mes del implante de la matriz de regeneración. Color claro = núcleos de células. Color oscuro = células positivas para Tuj-1. Color negro = doble tinción. El aumento es de 200x.

La Figura 38 muestra la evaluación microscópica de un corte longitudinal procedente de un estudio de regeneración de médula espinal de rata. 38A: las células primitivas asociadas con la matriz de regeneración están rellenando el defecto de la médula espinal. Tomado a un aumento de 10x. 38B: células primitivas en el sitio de formación de tejido neural nuevo 10 días después de implantar la matriz de regeneración en un defecto de médula espinal de 10 mm. Tomado a un aumento de 40x.

Descripción detallada de determinadas realizaciones

Definiciones

“Muestra acelular”: la expresión “muestra acelular” como se utiliza en el presente documento se refiere a una muestra biológica generada eliminando células de una muestra de tejido aislada. En determinadas realizaciones se utiliza una muestra acelular para generar una matriz de regeneración de tejido bioabsorbible acelular. Una muestra acelular se genera a partir de sangre.

En determinadas realizaciones se genera una muestra acelular pasando una muestra de tejido a través de un filtro con un diámetro de filtración suficientemente pequeño para excluir que las células pasen a través de tal filtro. En determinadas realizaciones se genera una muestra acelular sometiendo una muestra de tejido a centrifugación y utilizando el sobrenadante. Un experto en la materia conocerá otros procedimientos útiles para eliminar de células de una muestra de tejido. Se entiende que en la generación de una muestra acelular a partir de una muestra de tejido, algunas o todas las células pueden lisarse. En determinadas realizaciones, una muestra acelular comprende uno o más componentes procedentes de tales células lisadas. Una muestra acelular no presenta actividad metabólica sustancial (véase la definición de “actividad metabólica sustancial”, citado posteriormente).

“Bioabsorbible”, “bio-absorbible”: los términos “bioabsorbible” y “bio-absorbible” como se utilizan en el presente documento se refieren a la característica de existir durante un tiempo limitado en el contexto de un entorno biológico. En determinadas realizaciones, una matriz de regeneración de la presente invención y/o producida de acuerdo con uno o más procedimientos de la presente invención, es bioabsorbible. “Bioabsorbible” en el contexto de una matriz de regeneración bioabsorbible significa que la matriz de regeneración no sería reconocible como que existe en su forma inicial si se observa en un momento después de haberla colocado en el contexto de un entorno biológico. En determinadas realizaciones, una matriz de regeneración bioabsorbible puede existir durante días, semanas o meses cuando se coloca en el contexto de un entorno biológico. Por ejemplo, una matriz de regeneración bioabsorbible puede existir durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180 días, o más, cuando se coloca en el contexto de un entorno biológico. Una matriz de regeneración bioabsorbible puede ser bioabsorbible mediante cualquiera de una diversidad de mecanismos. En determinadas realizaciones, una matriz de regeneración bioabsorbible puede ser bioabsorbible a través de la acción de actividad celular. Por ejemplo, una matriz de

regeneración bioabsorbible es bioabsorbible a través de la acción de macrófagos que descomponen la matriz de regeneración bioabsorbible. En determinadas realizaciones, una matriz de regeneración bioabsorbible es bioabsorbible tras haberse descompuesto a través de degradación mecánica, química, metabólica y/o enzimática. Los expertos en la materia entenderán que el mecanismo preciso de bioabsorbibilidad no es crítico siempre que el cuerpo pueda absorber y/o excretar los productos de descomposición de la matriz de regeneración.

“Que incuba”: el término “que incuba” como se utiliza en el presente documento, en el contexto de la producción de una matriz de regeneración, se refiere al procedimiento de permitir que la matriz de regeneración se forme durante de un periodo de tiempo. En determinadas realizaciones se produce una matriz de regeneración incubando una muestra acelular en una cámara de incubación (véase la definición de “cámara de incubación”, citada posteriormente). En determinadas realizaciones se suspende y/o se solubiliza una muestra acelular en un medio de procedimiento durante la incubación. En determinadas realizaciones se produce una matriz de regeneración incubando una muestra acelular a cualquiera de una diversidad de temperaturas, siempre que la muestra acelular permanezca en un estado líquido. Por ejemplo, tal incubación puede realizarse a una temperatura de -2, -1, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 grados Celsius, o más alta, siempre que la muestra acelular permanezca en un estado líquido a estas temperaturas. En determinadas realizaciones, la temperatura puede aumentarse y/o disminuirse durante el período de incubación, de forma que la incubación se produce durante un intervalo de temperaturas. En determinadas realizaciones se produce una matriz de regeneración incubando una muestra acelular a cualquiera de una diversidad de presiones atmosféricas. Por ejemplo, una muestra acelular puede incubarse a Atmósfera Normal (“ATM”), o cualquier presión por encima o por debajo de la ATM. En determinadas realizaciones, la presión atmosférica se cambia durante la incubación de una muestra acelular. Por ejemplo, la presión atmosférica puede elevarse y/o reducirse durante la incubación. En determinadas realizaciones se produce una matriz de regeneración incubando una muestra acelular a cualquiera de una diversidad de concentraciones de oxígeno ambiental. En determinadas realizaciones la concentración de oxígeno ambiental es inferior que la concentración de oxígeno atmosférico convencional. Por ejemplo, la concentración de oxígeno ambiental durante la incubación puede ser de aproximadamente del 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 2, 1 % o menos. En determinadas realizaciones la concentración del oxígeno ambiental durante la incubación es casi o exactamente del 0 %. En determinadas realizaciones se produce una matriz de regeneración incubando una muestra acelular a cualquiera de una diversidad de humedades ambientales. En determinadas realizaciones, la humedad ambiental se mantiene baja durante la incubación de forma que la evaporación de líquido en la muestra acelular está aumentada. En determinadas realizaciones se añade de forma continua o periódica nuevo líquido que contiene solutos (que incluye, pero sin limitación, por ejemplo, un “medio de procedimiento” o “solución fisiológica”, véanse las definiciones citadas posteriormente) a una muestra acelular que se ha experimentado evaporación. En tales realizaciones, se entenderá que la osmolaridad de la muestra acelular aumenta a lo largo del tiempo como resultado de la evaporación y adición de nuevo líquido que contiene solutos. En determinadas realizaciones, se produce una matriz de regeneración incubando una muestra acelular en cualquiera de una diversidad de fuerzas de campo gravitatorio eficaces. En determinadas realizaciones se produce una matriz de regeneración incubando una muestra acelular a una fuerza de campo gravitatorio eficaz aproximadamente igual a la de la gravedad de la tierra (por ejemplo, al nivel del mar y/o a una o más alturas específicas sobre nivel del mar). En determinadas realizaciones se produce una matriz de regeneración incubando una muestra acelular a una fuerza de campo gravitatorio eficaz mayor que la gravedad de la tierra a nivel del mar. Por ejemplo, puede generarse una fuerza de campo gravitatorio eficaz mayor que la de la gravedad de la tierra mediante la incubación por debajo del nivel del mar o en una centrífuga, siempre que tal procedimiento no produzca ninguna agitación. En determinadas realizaciones se produce una matriz de regeneración incubando una muestra acelular en una fuerza de campo gravitatorio eficaz más baja que la de la gravedad de la tierra a nivel del mar. Por ejemplo, puede generarse una fuerza de campo gravitatorio eficaz más baja que la de la gravedad de la tierra mediante la incubación a altitudes elevadas o en el espacio.

“Cámara de incubación”: la expresión “cámara de incubación” como se utiliza en el presente documento se refiere a cualquiera de una diversidad de recipientes que pueden utilizarse para incubar (véase la definición de “incubar”, citado anteriormente) una muestra acelular durante la formación de una matriz de regeneración. En determinadas realizaciones, una cámara de incubación comprende un recipiente de laboratorio convencional, tal como un matraz, placa de cultivo, vaso de precipitado, etc. Un experto en la materia conocerá otros recipientes de laboratorio convencionales, adecuados y útiles. En determinadas realizaciones, una cámara de incubación comprende un recipiente sellado o semisellado. En determinadas realizaciones, una cámara de incubación es un recipiente sellado o semisellado que es permeable o semipermeable a una o más sustancias. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, una cámara de incubación comprende un recipiente que es permeable al aire y/o moléculas gaseosas. En determinadas realizaciones, una cámara de incubación comprende un casete Opticell® (BioCrystal Ltd., Westerville, OH). En determinadas realizaciones, se diseña una cámara de incubación sellada o semisellada de forma que el material pueda añadirse y/o retirarse del recipiente después de que haya comenzado el procedimiento de incubación. Por ejemplo, puede diseñarse una cámara de incubación que sea permeable o semipermeable al aire y/o moléculas gaseosas de forma que pueda añadirse y/o retirarse material líquido y/o sólido de la cámara una o más veces durante y/o tras la incubación. En determinadas realizaciones se diseña una cámara de incubación sellada o semisellada de forma que pueda añadirse y/o retirarse material a través del uso de una aguja o de otro instrumento que tenga la capacidad de penetrar la cámara de incubación. En determinadas realizaciones, es conveniente que la cámara de incubación sellada o semisellada se penetre con una aguja u otro instrumento que se

“resella” a sí mismo (y/o tiene la capacidad de ser resellado), de forma que la cámara de incubación conserva su estado sellado o semisellado.

“Matriz”: el término “matriz”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier estructura física que incluye, pero sin limitación, una estructura sólida o semisólida y/o una suspensión. En determinadas realizaciones la presente invención proporciona matrices que tienen características regenerativas (véase la definición de “regenerativo” citada posteriormente). Tal matriz regenerativa se denomina en el presente documento como una “matriz de regeneración”.

“Medio de procedimiento”: la expresión “medio de procedimiento” como se utiliza en el presente documento se refiere a una solución líquida que puede añadirse a una muestra de tejido, una muestra acelular o ambas durante el proceso de generación de una matriz de regeneración. En determinadas realizaciones un medio de procedimiento comprende una solución fisiológica (véase la definición de “solución fisiológica”, citada posteriormente). En determinadas realizaciones, un medio de procedimiento comprende una solución salina mínima. Por ejemplo, un medio de procedimiento puede ser PBS. Un experto en la materia conocerá otras soluciones salinas mínimas que pueden utilizarse en conformidad con la presente invención. Además, un experto en la materia conocerá composiciones y procedimientos útiles para modificar soluciones salinas mínimas para lograr uno o más propiedades convenientes de la solución que incluyen, pero sin limitación, el pH, la osmolaridad, la capacidad tamponadora, las concentraciones de uno o más iones particulares y/o cualquiera de una diversidad de otras propiedades de la solución. En determinadas realizaciones, un medio de procedimiento incluye uno o más agentes terapéuticos (véase la definición de “agente terapéutico”, citada posteriormente). En determinadas realizaciones se añade un medio de procedimiento a una muestra de tejido antes de, durante y/o después del aislamiento. En determinadas realizaciones, se añade un medio de procedimiento a muestra acelular antes de, durante y/o después de la eliminación de células. En determinadas realizaciones se añade un medio de procedimiento a una muestra celular durante el procedimiento de incubación. En determinadas realizaciones se añade un medio de procedimiento en múltiples momentos durante el procedimiento de incubación. En determinadas realizaciones, uno o más componentes de un medio de procedimiento añadido durante el procedimiento de producción de la matriz de regeneración se hacen parte de la matriz de regeneración producida.

“Solución fisiológica”: la expresión “solución fisiológica” como se utiliza en el presente documento se refiere a una solución que es similar o idéntica a una o más condiciones fisiológicas o que puede cambiar el estado fisiológico de un determinado entorno fisiológico. La expresión “solución fisiológica” como se utiliza en el presente documento también se refiere a una solución que tiene la capacidad de sustentar el crecimiento de células (que incluyen, pero sin limitación, células de mamífero, de vertebrado y/u otros). En determinadas realizaciones, una solución fisiológica comprende un medio definido, en el que la concentración de cada uno de los componentes del medio es conocida y/o está controlada. Los medios definidos normalmente contienen todos los nutrientes necesarios para sustentar el crecimiento celular, incluyendo, pero sin limitación, sales, aminoácidos, vitaminas, lípidos, elementos traza y fuentes de energía tales como hidratos de carbono. Los ejemplos no limitativos de medios definidos incluyen DMEM, Medio Basal de Eagle (BME), Medio 199; Mezcla Nutritiva F-12 (Ham); Mezcla Nutritiva F-10 (Ham); Medio Esencial Mínimo (MEM), Medio de Williams E y RPMI 1640. Un experto en la materia conocerá otros medios definidos que pueden utilizarse en conformidad con la presente invención. En determinadas realizaciones, una solución fisiológica comprende una mezcla de uno o más medios definidos. En determinadas realizaciones, una solución fisiológica es un medio complejo, en el cual al menos uno de los componentes del medio no es conocido ni está controlado. Aunque las soluciones fisiológicas son útiles en la producción de una matriz de regeneración de acuerdo con los procedimientos de la presente invención, como estará claro a partir de la totalidad de la presente descripción detallada, una muestra acelular que se incuba hasta producir una matriz de regeneración no contiene células (véase la definición de “muestra acelular” citada anteriormente). Como tal, aunque tal medio de procedimiento pueda tener la capacidad de sustentar el crecimiento celular, se entiende que el crecimiento celular no es un componente necesario de la producción de la matriz de regeneración. Sin embargo, en determinadas realizaciones, se pueden añadir células a la cámara de incubación en un momento o momentos concretos durante el procedimiento de formación de la matriz de regeneración. En estos casos se entiende que solución fisiológica por sí misma, o en combinación con la solución de la matriz de regeneración, puede sustentar la viabilidad de las células añadidas a la cámara de incubación.

“Regeneración”, “regenerar”, “regenerativo”: estos términos, según se utilizan en el presente documento, se refieren a cualquier procedimiento o cualidad que inicia, aumenta, modula, estimula, sustenta y/o dirige el crecimiento, el nuevo crecimiento, reparación, funcionalidad, estructuración, conectividad, el fortalecimiento, la vitalidad y/o el proceso de cicatrización natural de tejido débil, dañado, perdido y/o degenerado. Estos términos también pueden referirse a cualquier procedimiento o cualidad que inicia, aumenta, modula, estimula, sustenta y/o dirige el crecimiento, fortalecimiento, funcionalidad, vitalidad, robustez, potencia y/o salud de tejido débil, fatigado y/o normal. En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones y procedimientos útiles en la regeneración de tejido dañado, perdido y/o degenerado. Por ejemplo, los procedimientos y composiciones de la presente invención pueden emplearse para iniciar, aumentar, sustentar, estimular y/o dirigir la regeneración de tejido dañado, perdido y/o degenerado. En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona una matriz de regeneración (véase la definición de “matriz”, citada anteriormente) que presenta una o más propiedades o actividades regenerativas. En determinadas realizaciones, la regeneración comprende iniciar, aumentar, modular, estimular, sustentar y/o dirigir uno o más de los siguientes procesos: cicatrización natural, crecimiento tisular,

funcionalidad tisular, estructuración, conectividad, angiogénesis, proliferación y/o activación de células progenitoras, crecimiento y/o proliferación celular, especialización y/o alargamiento celular, desdiferenciación y/o diferenciación de células, regulación positiva de genes celulares relacionados con la regeneración y/o la inhibición de la formación de cicatrices. Sin embargo, la regeneración no se limita a estos procesos, cualidades o actividades, y un experto en la materia conocerá otros procesos, cualidades o actividades que se consideran en el campo “regeneración”, “regenerar” o “regenerativo”.

“Actividad metabólica sustancial”: la expresión “actividad metabólica sustancial” como se utiliza en el presente documento se refiere a la actividad metabólica que presentan normalmente las células intactas *in vitro* o *in vivo*. Las muestras acelulares y/o las matrices de regeneración de la presente invención carecen de células y, por lo tanto, no presentan actividad metabólica sustancial. Los expertos en la materia conocen una diversidad de técnicas mediante las cuales puede detectarse y/o medirse la actividad metabólica. Por ejemplo, las células intactas producen cantidades significativas de ATP mediante la descomposición aeróbica y/o anaeróbica de macromoléculas (por ejemplo, azúcares, aminoácidos, lípidos, etc.). Por lo tanto, la producción de niveles significativos de ATP normalmente es indicativa de la presencia de células intactas en una muestra. Un experto en la materia entenderá que puede detectarse en una muestra acelular determinado fenómeno indicativo de la presencia de células intactas. Sin embargo, normalmente tal fenómeno indicativo de células se observa a niveles o magnitudes más bajos o reducidos en comparación con el nivel o magnitud de tal fenómeno que se presenta como resultado de la presencia de células. Por lo tanto, por ejemplo, una muestra acelular y/o una matriz de regeneración pueden presentar niveles bajos de producción de ATP, cuyos niveles son sustancialmente más bajos que los niveles que se producirían si las células intactas estuvieran presentes en la muestra acelular y/o en la matriz de regeneración.

“Agente terapéutico”: la expresión “agente terapéutico” como se utiliza en el presente documento se refiere a cualquiera de una diversidad de agentes que presenta uno o más efectos terapéuticos beneficiosos cuando se utiliza junto con los procedimientos y/o matrices de regeneración de la presente invención.

Los ejemplos de agentes terapéuticos que pueden utilizarse con las matrices de generación y los procedimientos de la invención incluyen, pero sin limitación, proteínas, péptidos, fármacos, citocinas, moléculas de la matriz extracelular y/o factores de crecimiento. Un experto en la materia conocerá otros agentes terapéuticos adecuados y/o ventajosos que pueden utilizarse en conformidad con la presente invención. En determinadas realizaciones, la magnitud o (magnitudes) de uno o más efectos terapéuticos beneficiosos de un agente terapéutico se aumentan cuando se administra en una matriz de regeneración. En determinadas realizaciones, la actividad de uno o más efectos terapéuticos beneficiosos de un agente terapéutico se prolonga cuando se administra en una matriz de regeneración. En determinadas realizaciones, uno o más efectos terapéuticos beneficiosos de un agente terapéutico se producen a lo largo del tiempo cuando se administra una matriz de regeneración. En determinadas realizaciones, uno o más efectos beneficiosos de un agente terapéutico se protegen de la disminución sustancial a lo largo del tiempo cuando se administra en una matriz de regeneración. En determinadas realizaciones, dos o más agentes terapéuticos se administran en una matriz de regeneración.

“Muestra de tejido”: La expresión “muestra de tejido” como se utiliza en el presente documento se refiere a una muestra de sangre que comprende células y/o material extracelular. En determinadas realizaciones, una muestra de tejido comprende dos o más tipos distintos de tejidos. Una muestra de tejido puede aislarse a partir de cualquiera de una diversidad de organismos. Como ejemplos no limitativos, una muestra de tejido puede aislarse de un ser humano, un cerdo, una rata, una salamandra, una vaca, un perro, un gato, un ratón y/o un conejo. Un experto en la materia conocerá otros organismos adecuados a partir de los que puede aislarse una muestra de tejido.

La muestra de tejido se utiliza como material de partida para producir una matriz de regeneración. En determinadas realizaciones, la muestra de tejido utilizada para producir una matriz de regeneración se aísla del tipo de organismo en el que la matriz de regeneración se va a utilizar. Por ejemplo, una matriz de regeneración a utilizar en seres humanos puede producirse a partir de una muestra de tejido de partida aislada de seres humanos. En determinadas realizaciones se aísla una muestra de tejido utilizada para producir una matriz de regeneración del organismo individual en el que la matriz de regeneración se va a utilizar. Por ejemplo, una matriz de regeneración a utilizar en un individuo humano puede producirse a partir de una muestra de tejido de partida aislada de ese individuo humano. En determinadas realizaciones, se produce una matriz de regeneración a partir de sangre del individuo humano en el que la matriz de regeneración se va a utilizar.

Generalidades

En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona una matriz de regeneración que tiene la capacidad de iniciar, aumentar, sustentar y/o dirigir la regeneración tisular en un sitio de daño tisular. Por ejemplo, puede utilizarse una matriz de regeneración de acuerdo con la presente invención para regenerar tejido nervioso, tejido muscular, tejido hepático, tejido cardíaco, tejido pulmonar y/o tejido cutáneo.

La capacidad de una matriz de regeneración para reparar lesiones y/o tejido degenerado, que incluye, pero sin limitación, tejido del sistema nervioso central (SNC), se basa en la ciencia de la cicatrización y desarrollo de tejido. Aunque el proceso de cicatrización no se ha dilucidado completamente, la presente invención abarca el hallazgo de que una matriz de regeneración tiene la capacidad de iniciar, aumentar, sustentar y/o dirigir la regeneración de tejido dañado y/o degenerado.

Una ventaja de las matrices de regeneración de la presente invención es que tienen la capacidad de suprimir determinados procesos de cicatrización que no potencian la regeneración tisular, mientras potencian otros procesos que permiten que el paciente regenere tejido. El cuerpo es notable en que es capaz de repararse a sí mismo de forma rápida; sin embargo, determinados aspectos del proceso de cicatrización no permiten la funcionalidad regenerativa original encontrada en especies animales inferiores tales como las salamandras. Mediante la reducción de los rasgos no deseados, y la potenciación o reproducción de los rasgos convenientes de los procesos de cicatrización y desarrollo tisular, una matriz de regeneración tiene la capacidad de lograr resultados superiores. A diferencia de las especies animales inferiores tales como las salamandras, el proceso de cicatrización natural en seres humanos está programado para generar la mejoría más rápida de la lesión aislando el sitio de la lesión del resto del cuerpo con tejido cicatricial que, en el caso de la médula espinal u otra lesión del SNC, da como resultado una pérdida del restablecimiento de la función debida al efecto limitado o la falta de otros procesos de cicatrización paralelos. Lo mismo ocurre con las lesiones y la degeneración de otras partes del sistema nervioso central, así como en otros tejidos del cuerpo.

En determinadas realizaciones, los procedimientos y/o matrices de regeneración de la presente invención son útiles para el tratamiento de tejido nervioso dañado, perdido y/o degenerado, por ejemplo, tejido del sistema nervioso central. Clásicamente, ha habido una falta de progreso significativo y de un tratamiento disponible para las lesiones del sistema nervioso central, incluyendo las de la médula espinal. La razón principal para la falta de tratamientos regenerativos para tejidos, en especial tejido del sistema nervioso central, se debe a la naturaleza vital y altamente compleja de estos tejidos.

La presente invención abarca el hallazgo de que puede recuperarse la naturaleza biológica y estructural altamente compleja de la médula espinal en pacientes de LME con productos que contienen las actividades biológicas relevantes que inducen la recuperación de esta naturaleza biológica y estructural compleja, así como inducir la estructuración correcta y la reconexión de la médula espinal. Lo mismo ocurre con otras áreas del sistema nervioso central. Las matrices de regeneración de la presente invención están diseñadas para tener estas y otras características ventajosas. Además, pueden añadirse funcionalidades adicionales a las matrices de regeneración de la presente invención de una manera relativamente simple y sencilla. Hasta la fecha no se ha desarrollado otra formulación para el tratamiento del daño del SNC y de pacientes de LME con tal estrategia que integral para recuperar la funcionalidad compleja del sistema nervioso central, tal como la médula espinal en pacientes de LME.

Cicatrización

Durante el proceso de cicatrización están implicados distintos tipos de células en fases distintas del proceso de cicatrización, cada una con sus contribuciones exclusivas para la regeneración y la recuperación de la funcionalidad del tejido dañado. La primera línea de células proviene en general de la circulación sanguínea e incluye macrófagos, cuyo trabajo es limpiar el sitio del daño para crear espacio para el crecimiento de nuevas células y para liberar factores de crecimiento que activan las células que se necesitan en la siguiente fase del proceso de cicatrización. Aunque los macrófagos solos tienen un efecto relativamente pequeño sobre la regeneración de la médula espinal, esto es mejor que nada. Sin embargo, combinado con otros mecanismos de acción, los macrófagos activados pueden impartir un efecto más significativo sobre el proceso de regeneración. En determinadas realizaciones, se ha observado que al cabo de días tras su implante una matriz de regeneración de la presente invención aumenta la velocidad a la que los macrófagos activados entran en grandes cantidades al sitio de la lesión de la médula espinal, haciendo así innecesario inyectar cualquier macrófago activado en el sitio del daño tisular. Un experto en la materia entenderá, sin embargo, que aunque las matrices de regeneración de la invención inducen la invasión de macrófagos en un sitio de daño tisular, los macrófagos pueden, no obstante, administrarse en o cerca del sitio de la lesión junto con, o además de, una matriz de regeneración de la presente invención.

La siguiente etapa en el proceso de cicatrización natural es la incorporación de nuevos vasos sanguíneos y, en el caso de lesiones traumáticas, la incorporación de fibroblastos que crean una cicatriz que rodean el sitio de lesión traumática, de forma que el tejido no dañado circundante pueda continuar funcionando y compensando la pérdida de funcionalidad del tejido dañado mientras este se repara lentamente. Los factores de crecimiento liberados por los macrófagos activados inducen la incorporación de estos nuevos vasos sanguíneos y fibroblastos. Desafortunadamente, el sistema nervioso central está rodeado por una barrera hematoencefálica que restringe la invasión por parte de los macrófagos y el estímulo de la incorporación de nuevos vasos sanguíneos. Los factores inhibidores que circundan la barrera hematoencefálica, en especial en la lesión o degeneración del SNC, restringen la entrada de los nuevos vasos sanguíneos en el sitio de daño del SNC, dando como resultado fibroblastos y células gliales que forman cicatrices sin la formación simultánea de nuevos vasos sanguíneos. Las cicatrices resultantes se hacen muy gruesas e impenetrables, y la falta de nuevos vasos sanguíneos da a entender que el sitio de la lesión no puede reconstruirse. El resultado final es la formación de lesiones (estructuras huecas rodeadas por cicatrices gruesas e impenetrables), y el daño del SNC a largo plazo (crónico) y - en el caso de lesión de médula espinal - parálisis crónica. En determinadas realizaciones las matrices de regeneración de la presente invención contienen propiedades de cicatrización que desaceleran e inhiben la formación de cicatrices, mientras inducen de forma simultánea la formación de nuevos vasos sanguíneos. Dado que la falta de vasos sanguíneos da como resultado lesiones (cavidades llenas de líquido que carecen de células), es ventajoso que se formen nuevos vasos sanguíneos en y alrededor de estas lesiones y/o áreas en donde las lesiones están por formarse. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se formula la hipótesis de que las matrices de regeneración de la presente invención pueden crear

nuevos vasos sanguíneos mediante una ruta exclusiva: mediante la transdiferenciación (transformación) de macrófagos activados en células de tipo endotelial positivas para el factor de von Willebrand que forman de forma natural nuevos vasos sanguíneos (véanse las Figuras 1A, 1B y 1C). Por lo tanto, de acuerdo con esta hipótesis, después de que los macrófagos activados que fueron atraídos al sitio de la lesión del SNC mediante tal matriz de regeneración hayan hecho su trabajo de limpieza del sitio de daño, y de haber liberado factores de crecimiento, se transforman en nuevos tipos especializados de células que forman vasos sanguíneos nuevos. El resultado final es una extensa red nueva de vasos sanguíneos que proporcionan los nutrientes y el oxígeno para las células nuevas y el nuevo tejido del SNC nuevo. En modelos animales de lesión de SNC se ha encontrado que una matriz de regeneración implantada había ya empezado a crear una red de nuevos vasos sanguíneos (esta red de vasos sanguíneos no se asemeja al tipo de crecimiento de vasos sanguíneos visto en tumores, pero, en cambio, se asemeja a los tipos de redes de vasos sanguíneos de gran tamaño presentes en el desarrollo embrionario) al cabo de una semana del implante, con limitada presencia de cualquier cicatriz inhibidora (véanse, por ejemplo, las Figuras 2A, 2B, 2C y 2D).

Después de la formación de una nueva red de vasos sanguíneos, la siguiente etapa en el proceso de cicatrización normalmente implica la migración de las células circundantes al sitio de la lesión. Estas células migran al sitio de la lesión para alimentarse del suministro de nutrientes y oxígeno fresco proporcionado por los vasos sanguíneos formados de forma reciente. Desafortunadamente, en el caso del daño de tejido nervioso, las células nerviosas son las únicas células de largo plazo en el cuerpo que no migran y/o se dividen (multiplican) después de que se han diferenciado (transformado en células adultas) - si lo hicieran, perderíamos la memoria inherente a estas células cada vez que migrasen o se dividiesen, 'olvidando' en efecto esas memorias (ya sea somáticas o autónomas) de las que forma parte la célula nerviosa particular. Sin embargo, como sabe un experto en la materia, las células nerviosas tienen la capacidad de formar nuevas memorias y conexiones adicionales a través de la formación y/o extensión de axones y dendritas. En determinadas realizaciones, una matriz de regeneración induce un aumento de varias veces de la expresión de uno o más genes que son responsables de la formación y la estructuración correcta, y la conexión de tales nuevas conexiones en células nerviosas que circundan el sitio de la lesión (véase por ejemplo, las Figuras 18-19). En determinadas realizaciones una matriz de regeneración provoca que las células nerviosas se extiendan en el sitio de la lesión y hagan nuevas conexiones eficaces e inteligentes, tales como las que controlan, por ejemplo, los genes GAP-43 y los de la familia Netrina, que están regulados de forma positiva por la matriz de regeneración. Tales conexiones nuevas pueden utilizarse para generar una nueva funcionalidad del SNC que pueda aprovecharse por el entrenamiento y/o la enseñanza, conduciendo a una funcionalidad ventajosa del nuevo tejido del SNC. En determinadas realizaciones, tal nueva funcionalidad se logra en un período corto de tiempo, por ejemplo, dentro de una ventana de aproximadamente 2 meses. Como un ejemplo no limitativo, en el caso de lesión de la médula espinal, esto supondría entrenar/enseñar a los nervios como mover músculos de un modo coordinado para permitir el movimiento. Como otro ejemplo no limitativo, en el caso del área de Broca (el centro del habla) en el cerebro, esto supondría entrenar/enseñar a los nervios cómo crear un discurso coherente.

En determinadas realizaciones, las matrices de regeneración de la presente invención además potencian la formación de nuevo tejido del SNC mediante la incorporación y el aumento de la proliferación de células neuroprogenitoras trifásicas. Las células neuroprogenitoras trifásicas son un tipo de células jóvenes singulares y altamente móviles que los neurocientíficos han implicado como responsables del crecimiento espontáneo del nuevo tejido del SNC, en especial en el cerebro, observado en varios casos en seres humanos en donde el tejido del SNC dañado de la persona se reparó así mismo al menos de forma parcial. Las células neuroprogenitoras trifásicas han sido difíciles de estudiar *in vitro* (en una placa) debido a que por su naturaleza se diferencian (transforman) en células nerviosas o células gliales (células de sustento neuronal: astrocitos y oligodendrocitos) en el momento que se dan cuenta de que su entorno carece de una de estas células (parecen convertirse en el tipo de célula del que carece su entorno). Sin embargo, la presente invención abarca el hallazgo de que en presencia de una matriz de regeneración las células neuroprogenitoras trifásicas continúan proliferando hasta que la matriz de regeneración se retira o biodegrada (por ejemplo, en el cuerpo), en cuyo punto se transforman y crean una extensa red neuronal. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, una hipótesis es que como última etapa del proceso de generación de nuevo tejido del SNC las células neuroprogenitoras trifásicas rellenan de forma parcial las partes perdidas del tejido del SNC nuevo que se está creando que otras células nerviosas y gliales circundantes no llenaron durante su fase del proceso de regeneración de la matriz de regeneración. Independientemente del mecanismo preciso, el resultado final es que las células neuroprogenitoras trifásicas que son estimuladas para proliferar mediante las matrices de regeneración de la invención producen nuevo tejido nervioso.

En términos de las otras estrategias en el campo de la cicatrización, los productos y estrategias anteriores han dado como resultado mejoras significativas leves o dudosas en animales experimentales con respecto a los animales de control no tratado. Además, hasta la fecha los ensayos clínicos no han demostrado ninguna mejora significativa con respecto al placebo debida a estos productos de una sola estrategia. De forma adicional, en los implantes humanos en varios casos los problemas técnicos relacionados con las respuestas inmunológicas adversas han sido insuperables. Otras dificultades han incluido la incapacidad de entregar un producto a un paciente humano sin que el líquido cefalorraquídeo lo eliminara (el cual en un ser humano normalmente se mueve a una velocidad de aproximadamente 5 mm/min a una presión de 120 mm de H₂O) y/o provocar una lesión adicional significativa durante el implante. Las matrices de regeneración de la presente invención superan estas y otras dificultades. En determinadas realizaciones, la administración de las matrices de regeneración de la presente invención da como

resultado una mejora significativa en animales experimentales con respecto a los animales de control no tratados, sin efectos toxicológicos observados. Además, las matrices de regeneración de la presente invención se obtienen fácilmente en una forma que puede entregarse a un paciente humano sin problemas inmunológicos a largo plazo.

Producción de la matriz de regeneración

5 La presente invención abarca el hallazgo de que las matrices de regeneración pueden producirse mediante cualquiera de una diversidad de procedimientos. En determinadas realizaciones, distintos procedimientos de producción conducen a matrices de regeneración que presentan distintas características físicas, propiedades biológicas y/o actividades terapéuticas. Además, en determinadas realizaciones las características físicas, las propiedades biológicas y/o las actividades terapéuticas de las matrices de regeneración producidas de acuerdo con los procedimientos de la presente invención se modifican mediante la provisión de uno o más factores exógenos durante el proceso de producción.

Una matriz de regeneración puede formarse a partir de cualquier animal dentro del reino animal. En determinadas realizaciones se produce una matriz de regeneración a partir de sangre. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se formula la hipótesis de que las matrices de regeneración están formadas, al menos de forma parcial, por componentes de células que están experimentando, en especial, daño tisular masivo o están en la vecindad de tejido dañado. Para las células tal mecanismo parece ser un modo de inducir que las células circundantes regeneren el tejido dañado. En 1974 Becker y col. (Becker, R. O. y col., Regeneration of the ventricular myocardium in amphibians, Nature 248, 145-147, 1974) observaron, aunque no entendieron de forma completa, un fenómeno similar pero distinto mientras estudiaban los corazones de tritones. Becker observó que cuando se cortaba el 30 % - 50 % del corazón del tritón, los glóbulos rojos circundantes se lisaban y sus núcleos liberados se agregaban para formar nuevo tejido de miocardio, permitiendo que el corazón del tritón se regenerara en aproximadamente 4 horas y permitiendo así que muchos de los tritones sobrevivieran. Como estará claro a partir del resto de la presente descripción, las matrices de regeneración de la presente invención son distintas de y operan a través de un mecanismo distinto del fenómeno observado por Becker y col., dado que las matrices de regeneración de la presente invención se producen a partir de una muestra acelular y por su cuenta no se convierten en un tejido vivo a base de células. No obstante, en determinadas realizaciones, las matrices de regeneración de la presente invención se siembran o mezclan con células durante o después de su formación, para conferir una o más características o funciones beneficiosas en la matriz de regeneración. Como se entenderá, sin embargo, tales células no son necesarias para la formación de las matrices de regeneración de la presente invención.

30 Una matriz de regeneración puede producirse a partir de sangre completa y/o a partir de una o más fracciones de la sangre. En el caso en donde se produce una matriz de regeneración a partir de sangre completa, los componentes proteínicos principales de la matriz de regeneración son normalmente albúmina y hemoglobinas. En el caso en donde se produce una matriz de regeneración a partir de la fracción plasmática-plaquetaria-leucocitaria de la sangre, la albúmina es normalmente un componente proteínico principal de la matriz de regeneración. No obstante, las matrices de regeneración producidas a partir de sangre completa y de la fracción plasmática-plaquetaria-leucocitaria, funciona cada una para iniciar, aumentar, sustentar y/o dirigir la regeneración tisular en un sitio de daño, pérdida y/o degeneración tisular. En determinadas realizaciones, se produce una matriz de regeneración a partir de una muestra acelular generada a partir de sangre completa.

40 En determinadas realizaciones, se produce una matriz de regeneración a partir de una muestra acelular generada a partir de una o más fracciones de la sangre incluyendo, pero sin limitación, una fracción de eritrocitos, una fracción leucocitaria, una fracción plaquetaria y/o una fracción plasmática. Tales fracciones pueden generarse, por ejemplo, permitiendo que la sangre completa se asiente y se separe por gravedad. En determinadas realizaciones las fracciones de la sangre se generan por centrifugación. Un experto en la materia conocerá otras técnicas para separar la sangre en fracciones, cuyas fracciones pueden utilizarse para producir una matriz de regeneración de la presente invención. En determinadas realizaciones se produce una matriz de regeneración a partir de sangre o ésta se ha congelado. En determinadas realizaciones, tal sangre se ha congelado durante un período de días, semanas, meses o años. En determinadas realizaciones se obtienen rendimientos y un desarrollo mejores de matrices de regeneración cuando la sangre se somete a múltiples ciclos de congelación descongelación a un intervalo de temperatura que está cerca del punto de congelación-fusión de la muestra. En determinadas realizaciones, se produce una matriz de regeneración a partir de sangre que se aísla de cadáveres (por ejemplo, cadáveres que son de varias semanas). En determinadas realizaciones se produce una matriz de regeneración a partir de sangre placentaria o de cordón umbilical. Un experto en la materia conocerá otras fuentes de sangre que pueden utilizarse para producir una matriz de regeneración.

55 Además, en el caso de la sangre completa, como se muestra en los Ejemplos 1 y 2, la presencia de un anticoagulante en la muestra de sangre da como resultado matrices de regeneración con distintas propiedades adhesivas. Pueden utilizarse cualquiera de una diversidad de anticoagulantes que incluyen, pero sin limitación, heparina, EDTA y/o citrato. Un experto en la materia conocerá otros anticoagulantes, así como coagulantes, que pueden utilizarse para producir matrices de regeneración con distintas características físicas, propiedades biológicas y/o actividades terapéuticas.

60 En determinadas realizaciones se genera una muestra acelular eliminando células de una muestra de tejido. Para eliminar tales células puede utilizarse cualquiera de una diversidad de técnicas. Por ejemplo, puede someterse a una

muestra de tejido a centrifugación para separar la muestra de tejido en fracciones que contienen células y que no contienen células, en que la, después, fracción que no contiene células se aísla. En determinadas realizaciones, las células se eliminan a partir de una muestra de tejido pasando la muestra de tejido a través de un filtro con un tamaño de poro suficientemente pequeño para excluir células. Por ejemplo, las células pueden eliminarse a partir de una muestra de tejido pasando la muestra de tejido a través de un filtro con un tamaño de poro de 5 μm , 1,2 μm y/o 0,8 μm . En determinadas realizaciones, el tamaño de poro del filtro modifica las características físicas, las propiedades biológicas y/o las actividades terapéuticas de la matriz de regeneración producida. El profesional puede determinar el tamaño de poro exacto dependiendo de las limitaciones experimentales y/o de laboratorio, las características deseadas de la matriz de regeneración y/o cualquiera de una diversidad de otros factores considerados como importantes por el profesional. En determinadas realizaciones se suspende, solubiliza y/o diluye una muestra de tejido antes de eliminar las células. Por ejemplo, antes de eliminar las células de la muestra de tejido se puede suspender, solubilizar y/o diluir una muestra de tejido en un medio de procedimiento y/o una solución fisiológica.

Se puede producir una matriz de regeneración incubando una muestra acelular durante cualquiera de una diversidad de tiempos de incubación. Por ejemplo, una muestra acelular puede incubarse durante 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 o más días. Se ha detectado la matriz de regeneración funcional en ensayos *in vitro* en una matriz de regeneración producida después de 6 días, 12 días, 15 días, 21 días y 28 días, y ha permanecido funcional con un período de incubación más largo de 6 semanas o más. Modificando los parámetros ambientales y/o un medio de procedimiento utilizado en el procedimiento de producción pueden producirse matrices de regeneración funcionales en un periodo de tiempo más corto. Por ejemplo, disminuyendo la concentración de oxígeno hasta aproximadamente el 0 % y/o aumentando las propiedades de agregación o los efectos del medio de procedimiento mediante, por ejemplo, el aumento de su concentración de sales, pueden producirse matrices de regeneración funcionales al cabo de minutos, horas o unos pocos días. En determinadas realizaciones la actividad de una matriz de regeneración producida incubando una muestra acelular aumenta a medida que aumenta el período de incubación. En determinadas realizaciones, una matriz de regeneración producida incubando una muestra acelular alcanza una actividad máxima o casi máxima tras un período de incubación. En tales realizaciones, una matriz de regeneración aumenta, en todo caso, la actividad solo de forma gradual como resultado de una incubación adicional. En tales realizaciones, es posible que la matriz de regeneración pueda perder actividad como resultado de la incubación adicional.

El primer inventor ha descubierto que la agitación, o perturbar de otra forma la muestra acelular durante la formación inicial de la matriz de regeneración da como resultado una matriz de regeneración incompleta y/o defectuosa, y/o la falta por completo de una matriz de regeneración producida (así como una disminución correspondiente de la actividad biológica de tales matrices de regeneración incompletas y/o defectuosas). En determinadas realizaciones se incuba una muestra acelular de forma que la muestra no se agita o se perturba de otra forma, durante el período de tiempo en que se está formando la matriz de regeneración. Por ejemplo, puede incubarse una muestra acelular en ausencia de agitación o de otra perturbación durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 días o más. En determinadas realizaciones, se incuba una muestra acelular de forma que la muestra no se agita o se perturba de otra forma durante el tiempo total en que se forma la matriz de regeneración.

Determinadas condiciones de incubación y/o la adición de uno o más factores exógenos durante el procedimiento de producción pueden modificar el tiempo de incubación necesario para que la matriz de regeneración logre un nivel de actividad deseado. Como un ejemplo no limitativo, la disminución de la concentración ambiental de oxígeno disminuye la cantidad de tiempo necesario para lograr un nivel deseado de actividad de la matriz de regeneración. En determinadas realizaciones, la concentración del oxígeno ambiental durante la incubación es aproximadamente del 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % o menos. En determinadas realizaciones, la concentración del oxígeno ambiental durante la incubación es casi o exactamente del 0 %. En determinadas realizaciones, la incubación en un entorno de bajo oxígeno da como resultado una matriz de regeneración con un nivel de actividad deseado en tan poco como 3 días. En determinadas realizaciones, la incubación en un entorno de bajo oxígeno da como resultado una matriz de regeneración con un nivel de actividad deseado en tan poco como 7 días. En determinadas realizaciones, la concentración del oxígeno ambiental durante la incubación se modifica (por ejemplo, se eleva y/o se reduce) durante el procedimiento de incubación. Un experto en la materia tendrá la capacidad de elegir una o más concentraciones de oxígeno ambiental apropiadas, dependiendo de las limitaciones de tiempo en la formación de la matriz de regeneración, del tipo de daño tisular para el que la matriz de regeneración se utilizará, las limitaciones experimentales y/o de laboratorio, y/o cualquiera de una diversidad de otros factores considerados importantes por el profesional.

En determinadas realizaciones durante la incubación se ajusta o controla la humedad ambiental. Por ejemplo, se produce una matriz de regeneración incubando una muestra acelular a cualquiera de una diversidad de humedades ambientales. En determinadas realizaciones, durante la incubación se mantiene baja la humedad ambiental de forma que se aumenta la evaporación de líquido en la muestra acelular. En determinadas realizaciones se añade de forma continua o periódica nuevo líquido que contiene solutos (por ejemplo, un "medio de procedimiento" y/o "solución fisiológica") a una muestra acelular que se ha sometido a evaporación. En tales realizaciones, se entenderá que la osmolaridad de la muestra acelular aumenta a lo largo del tiempo como resultado de la evaporación y la adición de líquido que contiene solutos nuevo. En determinadas realizaciones, tal aumento de la osmolaridad da como

resultado un cambio en las características fisiológicas, propiedades biológicas y/o las actividades terapéuticas de la matriz de regeneración producida. Como un ejemplo no limitativo, se ha demostrado que el aumento de la osmolaridad de una solución y/o suspensión que contiene la muestra acelular durante el procedimiento de incubación, da como resultado una matriz de regeneración con una consistencia física más sólida con respecto a una matriz de regeneración producida mediante un procedimiento en el que la osmolaridad no se aumenta, o se aumenta en menor cantidad. Tal matriz de regeneración puede utilizarse como una composición implantable cuando se desea que la matriz de regeneración conserve una determinada forma física durante un periodo prolongado de tiempo. Una matriz de regeneración que tiene una consistencia física menos sólida (por ejemplo, tal como una matriz de regeneración producida mediante un procedimiento en donde la osmolaridad se mantiene constante o se aumenta en una menor cantidad) es para el uso cuando se desea, por ejemplo, inyectar una matriz de regeneración a un sujeto. En determinadas realizaciones se modifica la humedad ambiental (por ejemplo, se eleva y/o reduce) durante el procedimiento de incubación, para controlar la velocidad de cambio en la osmolaridad. Un experto en la materia tendrá la capacidad de elegir una o más humedades ambientales apropiadas dependiendo de las limitaciones de tiempo en la formación de la matriz de regeneración, del tipo de daño tisular para el cual la matriz de regeneración se utilizará, de las limitaciones experimentales y/o de laboratorio, y/o cualquiera de una diversidad de otros factores considerados importantes por el profesional. Además, la densidad, la porosidad y/o el nivel de hidratación de la matriz de regeneración formada pueden cambiarse mediante centrifugación o liofilización de la matriz de regeneración formada. Por ejemplo, la matriz de regeneración formada podría centrifugarse a 5000 x g para aumentar su densidad y dureza para el implante en un defecto óseo, para sustentar la regeneración del hueso.

En determinadas realizaciones las matrices de regeneración de la presente invención se producen incubando una muestra acelular durante un período de tiempo en una cámara de incubación. Puede utilizarse cualquiera de una diversidad de cámaras de incubación. En determinadas realizaciones una cámara de incubación comprende un recipiente sellado o semisellado que es permeable o semipermeable a una o más sustancias, por ejemplo, aire y/o moléculas gaseosas. Por ejemplo, puede utilizarse como cámara de incubación un casete Opticell® (BioCrystal Ltd., Westerville, OH), para producir una matriz de regeneración a partir de una muestra acelular. En determinadas realizaciones se diseña una cámara de incubación sellada o semisellada de forma que pueda añadirse y/o retirarse material del recipiente después de que el procedimiento de incubación haya comenzado. Por ejemplo, una cámara de incubación que es permeable o semipermeable al aire y/o moléculas gaseosas puede diseñarse de forma que pueda añadirse y/o retirarse de la cámara material líquido y/o sólido, una o más veces durante y/o después de la incubación. Tales cámaras de incubación son ventajosas cuando es conveniente aumentar la osmolaridad de la muestra acelular durante el procedimiento de incubación. Por ejemplo, durante el procedimiento de incubación puede aumentarse la osmolaridad de la muestra acelular permitiendo que el disolvente de una solución o suspensión líquida que contiene la muestra acelular (cuya solución o disolvente puede generarse, por ejemplo, añadiendo un medio de procedimiento o una solución fisiológica a la cámara acelular y/o a una muestra de tejido a partir de la cual se genera la muestra acelular) se evapore a lo largo del tiempo, y se añade de forma continua o periódica nuevo líquido que contiene solutos a la muestra acelular. Tal líquido que contiene solutos puede comprender un medio de procedimiento y/o una solución fisiológica. En el caso en donde se ha solubilizado o suspendido una muestra acelular en un medio de procedimiento y/o una solución fisiológica, durante el procedimiento de incubación puede añadirse a la muestra acelular el mismo medio de procedimiento y/o solución fisiológica. De forma adicional o como alternativa, durante el procedimiento de incubación puede añadirse a la muestra acelular un medio de procedimiento y/o una solución fisiológica distintos. De forma adicional o como alternativa, un líquido que contiene solutos a añadir a la muestra acelular no es ni medio de procedimiento ni solución fisiológica.

En determinadas realizaciones una matriz de regeneración presenta características físicas, propiedades biológicas y/o actividades terapéuticas distintas, dependiendo del medio de procedimiento y/o de la solución fisiológica utilizados durante el procedimiento de producción. Por ejemplo, como se muestra en el Ejemplo 11, una matriz de regeneración producida utilizando medios TR-10 presenta una actividad biológica aumentada en comparación con una matriz de regeneración producida utilizando los medios de DMEM/F-12. Un experto en la materia tendrá la capacidad de determinar los medios de procedimiento y/o los medios fisiológicos apropiados para lograr una matriz de regeneración que presente una o más características físicas, propiedades biológicas y/o actividades terapéuticas deseadas sin excesiva experimentación.

Puede añadirse a la muestra de tejido y/o muestra acelular un medio de procedimiento y/o una solución fisiológica a cualquiera de una diversidad de puntos de tiempo durante el procedimiento de producción de la matriz de regeneración. En determinadas realizaciones, durante el aislamiento de la muestra de tejido se añade un medio de procedimiento a la muestra de tejido y/o muestra acelular, antes de la eliminación de células de la muestra de tejido, antes de incubar la muestra acelular y/o durante el procedimiento de incubación.

En determinadas realizaciones se produce una matriz de regeneración incubando una muestra acelular en presencia de uno o más factores exógenos. Por ejemplo, puede incubarse una muestra acelular en presencia de uno o más agentes terapéuticos, uno o más tipos celulares, o ambos. En determinadas realizaciones tales factores exógenos modifican las características físicas y/o aumentan las actividades biológicas y/o terapéuticas de una matriz de regeneración. Por ejemplo, como se muestra en el Ejemplo 9, una matriz de regeneración complementada por la adición de ITS, EGF y bFGF durante la producción de la matriz de regeneración da como resultado un efecto aumentado de la matriz de regeneración sobre la actividad de extensión de neuritas.

Para aumentar y/o complementar la actividad de las matrices de regeneración de la presente invención puede utilizarse cualquiera de una diversidad de agentes terapéuticos. Los ejemplos de agentes terapéuticos que pueden utilizarse con las matrices de regeneración y procedimientos de la invención incluyen, pero sin limitación, proteínas, péptidos, fármacos, citocinas, moléculas de la matriz extracelular y/o factores de crecimiento. Un experto en la materia conocerá otros agentes terapéuticos adecuados y/o ventajosos que pueden utilizarse en conformidad con la presente invención. En determinadas realizaciones, cuando se administra en una matriz de regeneración se aumenta la magnitud (o magnitudes) de uno o más efectos terapéuticos beneficiosos de un agente terapéutico. En determinadas realizaciones, la actividad de uno o más efectos terapéuticos beneficiosos de un agente terapéutico se prolonga cuando se administra en una matriz de regeneración. En determinadas realizaciones, cuando se administra un agente terapéutico en una matriz de regeneración se producen a lo largo del tiempo uno o más efectos terapéuticos beneficiosos. En determinadas realizaciones cuando se administran en una matriz de regeneración se protegen de la disminución de forma sustancial a lo largo del tiempo uno o más efectos beneficiosos de un agente terapéutico. En determinadas realizaciones, se administran dos o más agentes terapéuticos en una matriz de regeneración. En determinadas realizaciones, se añade un agente terapéutico durante el procedimiento de producción de una matriz de regeneración. Por ejemplo, puede añadirse un agente terapéutico en una o más etapas del procedimiento de producción incluyendo, pero sin limitación, durante el aislamiento de la muestra de tejido, antes de la eliminación de células de la muestra de tejido, antes de la incubación de la muestra acelular y/o durante el procedimiento de incubación.

En determinadas realizaciones se distribuye un agente terapéutico por toda la matriz de regeneración de forma uniforme. En determinadas realizaciones, se distribuye un agente terapéutico por toda la matriz de regeneración de forma heterogénea. Por ejemplo, un agente terapéutico puede estar más concentrado en o cerca del núcleo de una matriz de regeneración. Esto podría lograrse, por ejemplo, introduciendo el agente terapéutico durante los primeros días o la primera mitad del período de formación de la matriz de regeneración, seguido de la retirada de la mayoría o de toda la solución que circunda la matriz de regeneración en formación en la cámara de incubación, añadiendo a la cámara de incubación más de la muestra acelular inicial o de la solución hasta que se logra un nivel deseado, y después incubando adicionalmente la muestra acelular y la matriz de regeneración para continuar el procedimiento de formación de la matriz de regeneración. La muestra acelular o solución adicional podría también añadirse junto con otro agente terapéutico, que después se concentraría de forma heterogénea más cerca de la superficie exterior de la matriz de regeneración en formación y, de este modo, se liberaría en su entorno circundante más temprano que el primer agente terapéutico, cuando la matriz de regeneración se biodegrada o se degrada; este procedimiento podría utilizarse en aplicaciones en donde se desea que los agentes terapéuticos se entreguen en distintos puntos de tiempo (por ejemplo, uno después del otro) en un sitio específico. En determinadas realizaciones, tal distribución heterogénea afecta las propiedades y/o función del agente terapéutico *in vivo*. Por ejemplo, tal distribución heterogénea puede dar como resultado una modificación de la magnitud (o magnitudes) de uno o más efectos terapéuticos beneficiosos del agente terapéutico, la prolongación de la actividad de uno o más efectos terapéuticos beneficiosos del agente terapéutico, una modificación de las características de liberación prolongada de uno o más efectos terapéuticos beneficiosos del agente terapéutico y/o la protección de uno o más efectos beneficiosos del agente terapéutico de la disminución sustancial a lo largo del tiempo.

Para aumentar y/o complementar la actividad de las matrices de regeneración de la presente invención puede utilizarse cualquiera de una diversidad de tipos celulares. Sin embargo, aunque pueden utilizarse células para aumentar y/o complementar la actividad de las matrices de regeneración de la presente invención, se entenderá que tales células no se necesitan para formar una matriz de regeneración. En determinadas realizaciones, se añaden células a una forma de muestra acelular cuyas células se han eliminado. En determinadas realizaciones, se utilizan células de un tipo distinto de las células presentes en la muestra de tejido de la que la muestra acelular se generó. Los ejemplos de tipos celulares que pueden utilizarse en conformidad con la presente invención incluyen, pero sin limitación, células madre, células progenitoras y/o células somáticas. Un experto en materia conocerá otros tipos celulares adecuados y/o ventajosos que pueden utilizarse en conformidad con la presente invención. En determinadas realizaciones durante el procedimiento de producción de una matriz de regeneración se añaden células. Por ejemplo, pueden añadirse células en una o más etapas del procedimiento de producción incluyendo, pero sin limitación, durante el aislamiento de la muestra de tejido, antes de la eliminación de células de la muestra de tejido, antes de la incubación de la muestra acelular y/o durante el procedimiento de incubación. En determinadas realizaciones, las células se distribuyen por toda la matriz de regeneración de forma uniforme. En determinadas realizaciones, las células se distribuyen de forma heterogénea por toda la matriz de regeneración. Por ejemplo, las células pueden estar más concentradas en o cerca del núcleo de una matriz de regeneración. En determinadas realizaciones, tal distribución heterogénea afecta a las propiedades y/o la función de las células *in vivo*.

Uno de los modos más eficaces para producir una matriz de regeneración promisorio para el implante en un paciente, sin desencadenar una respuesta inmunitaria significativa, es obtener la matriz de regeneración a partir de la propia sangre y/o tejido del paciente. Sin embargo, las matrices de regeneración de la presente invención no se limitan a tales matrices de regeneración autólogas. En determinadas realizaciones, se fabrican matrices de regeneración prefabricadas para el implante inmediato utilizando sangre u otro tejido alogénico. En tales realizaciones, puede ser conveniente administrar tal matriz de regeneración alogénica junto con uno o más agentes inmunosupresores. Los ejemplos de tales agentes inmunosupresores son conocidos para los expertos en la materia. En determinadas realizaciones, se obtiene una matriz de regeneración para su uso en una especie de células de

una especie distinta. Por ejemplo, se administra a un ser humano una matriz de regeneración producida utilizando tejido obtenido de un animal (por ejemplo, cerdos). En determinadas realizaciones las matrices de regeneración de la presente invención son útiles en aplicaciones veterinarias, por ejemplo para reparar tejido dañado y/o degenerado de ganado de producción y/o mascotas.

- 5 En determinadas realizaciones las características físicas, las propiedades biológicas y/o las actividades terapéuticas de una matriz de regeneración se modifican después de que el procedimiento de producción está sustancialmente o completamente finalizado. Por ejemplo, en muchos casos será conveniente almacenar una matriz de regeneración durante un periodo prolongado de tiempo después de que se fabrica. Como se conoce en la técnica, la hidrólisis es una causa de acortamiento de la vida útil de almacenamiento para una diversidad de sustancias biológicas y no biológicas. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, la vida útil de almacenamiento de las matrices de regeneración de la presente invención puede aumentarse retirando algo, o todo, del líquido presente en tal matriz de regeneración. Para retirar tal líquido puede utilizarse cualquiera de una diversidad de técnicas. Por ejemplo, para condensar los componentes proteínicos y/u otros componentes macromoleculares biológicos puede centrifugarse una matriz de regeneración, después de lo cual se retira una cantidad de líquido deseada de la muestra centrifugada. De forma adicional o como alternativa, puede retirarse líquido de una matriz de regeneración sometiendo a la matriz de regeneración a una etapa de filtración (por ejemplo, por gravedad o centrifugación a baja velocidad), utilizando un filtro con un tamaño de poro suficientemente grande como para pasar líquido pero suficientemente pequeño de forma que el material de la matriz de regeneración no lo traspase. De forma adicional o como alternativa, puede retirarse líquido de una matriz de regeneración deshidratando la matriz de regeneración durante un periodo de tiempo, ya sea en presencia o ausencia de deshidratantes. Un experto en la materia conocerá otros procedimientos apropiados y/o útiles para retirar líquido de una matriz de regeneración para mejorar su vida útil de almacenamiento. Se entenderá que la retirada de líquido de una matriz de regeneración también puede modificar una o más de sus propiedades biológicas y/o actividades terapéuticas. En determinadas realizaciones mediante el procedimiento de retirada de líquido se aumentan tales propiedades biológicas y/o actividades terapéuticas.
- 25 Además, tal retirada de líquido puede dar como resultado una ventaja adicional mediante la modificación de las características físicas de una matriz de regeneración, de forma que la matriz de regeneración coincide de forma más estrecha con el entorno físico en el que se va a administrar. Por ejemplo, la disminución del nivel de hidratación de la matriz de regeneración puede dar como resultado una matriz de regeneración con una densidad mayor. Tal matriz de regeneración densa puede utilizarse de forma ventajosa, por ejemplo, en la regeneración de hueso y/o cartilago.
- 30 Un experto en la materia conocerá, a base de esta descripción, otras aplicaciones ventajosas de tales matrices de regeneración densas y tendrá la capacidad de utilizar tales matrices de regeneración en tales aplicaciones sin experimentación excesiva.

Composición y características de la matriz de regeneración

- 35 Las matrices de regeneración de la presente invención comprenden una mezcla heterogénea de proteínas, lípidos, hidratos de carbono, sales y ácidos nucleicos. Además, las matrices de regeneración se han almacenado a temperaturas refrigeradas durante hasta 3 meses sin pérdida de función. Presumiblemente, una matriz de regeneración podría almacenarse de forma indefinida utilizando condiciones apropiadas. Por ejemplo, el contenido en agua de una matriz de regeneración puede disminuirse (por ejemplo, a través de centrifugación, deshidratación, liofilización, etc.) para aumentar el tiempo que puede almacenarse. En determinadas realizaciones la estructura principal consiste de forma mayoritaria en agregados de estructuras esféricas de aproximadamente 1 a 4 μm de diámetro. En determinadas realizaciones, la estructura principal consiste de forma mayoritaria en agregados de estructuras esféricas de aproximadamente 100 nm de diámetro. En determinadas realizaciones, la estructura principal consiste de forma mayoritaria en agregados de estructuras esféricas de al menos aproximadamente 100 nm de diámetro. En determinadas realizaciones, las matrices de regeneración comprenden tales estructuras esféricas con fibras intercaladas por todas partes. Como se describe anteriormente, las condiciones de procesamiento utilizadas para formar el material de partida pueden afectar el tamaño final de las estructuras esféricas. Por ejemplo, si el material de partida se filtra a través de un filtro de 5 μm , las estructuras esféricas predominantes son normalmente de aproximadamente 2 a 4 μm de diámetro. Si el material de partida se filtra a través de un filtro de 1,2 μm , las estructuras predominantes son normalmente de aproximadamente 1 a 2 μm de diámetro.

- 55 En determinadas realizaciones los anticuerpos anti CD56 reconocen la superficie de las esferas, lo que indica la presencia de la molécula de adhesión celular neural (NCAM). Sin pretender quedar ligado a teoría alguna, se formula la hipótesis de que la estimulación mediada por NCAM es un mecanismo mediante el cual la matriz de regeneración reconoce células neuronales y estimula la regeneración después del daño. En determinadas realizaciones, durante la reparación tisular, la regeneración tisular y/o la formación tisular, la matriz de regeneración actúa como una matriz de crecimiento extracelular (MCEC). Cuando se forma una matriz de regeneración a partir de sangre, las propiedades físicas y funcionales están afectadas por el procedimiento de recolección de la sangre (por ejemplo, la presencia o ausencia de anticoagulantes y/o el tipo de anticoagulante) así como por el tamaño de poro utilizado para filtrar el lisado antes del periodo de incubación. Cuando la sangre se recolecta con el anticoagulante heparina se forman estructuras similares a las formadas con sangre recolectada sin anticoagulante. La matriz de regeneración formada a partir de esta sangre completa en general se une tanto a la parte inferior como a la superior del dispositivo de producción (por ejemplo, Opticell®), con una disposición de estructuras ligeramente distinta sobre

las respectivas superficies. Sin embargo, cuando la sangre se recoge con los anticoagulantes EDTA o citrato, la matriz de regeneración formada a partir de la sangre completa está unida de forma débil al dispositivo de producción y tiene un aspecto y consistencia similar a gel.

5 En determinadas realizaciones, las matrices de regeneración de la presente invención comprenden agua como su ingrediente principal. En determinadas realizaciones, la composición no acuosa de una matriz de regeneración comprende principalmente proteína. En determinadas realizaciones, el contenido proteínico de una matriz de regeneración varía desde aproximadamente el 5 al 15 % en masa. Sin embargo, este porcentaje puede manipularse utilizando distintas proporciones de muestra de tejido y/o de muestra acelular con respecto al medio de procedimiento en el procedimiento de producción. En determinadas realizaciones, empleando tales proporciones distintas, el contenido de proteína de la matriz de regeneración producida es aproximadamente del 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 % o más. Este porcentaje puede cambiarse además modificando el nivel de hidratación de la matriz de regeneración producida. En determinadas realizaciones, empleando tales modificaciones en el nivel de hidratación de la matriz de regeneración, el contenido proteínico de la matriz de regeneración puede ser menor que aproximadamente el 0,1 % o más que 15 aproximadamente el 90 %. En el caso en donde se produce una matriz de regeneración a partir de sangre completa, los componentes proteínico principales de la matriz de regeneración son normalmente albúmina y hemoglobinas. En el caso en donde se produce una matriz de regeneración a partir de la fracción plasmática-plaquetaria-leucocitaria de la sangre, un componente proteínico principal de la matriz de regeneración es normalmente albúmina. Sin embargo, un experto en la materia entenderá que en estas matrices de regeneración también están presentes otros 20 constituyentes proteínicos o peptídicos de la sangre. Además, un experto en la materia entenderá que pueden estar presentes otros constituyentes proteínicos o peptídicos cuando la matriz de regeneración se produce a partir de una muestra acelular generada a partir de otro tejido que no sea sangre.

Una matriz de regeneración tiene importantes propiedades y potencial regenerativos y de formación de tejido. Puede servir como una ayuda y/o un almacén para las células implicadas en la regeneración tisular y la formación tisular. 25 En determinadas realizaciones, las matrices de regeneración de la presente invención permiten a las células unirse, proliferar y/o diferenciarse en o alrededor de las matrices de regeneración. En determinadas realizaciones, las matrices de regeneración de la presente invención estimulan a las neuronas a extender las prolongaciones neuronales para unirse a la matriz de regeneración. Los ensayos de cultivos celulares *in vitro* que utilizan células neurales han demostrado que una matriz de regeneración estimula de forma selectiva genes que se asocian con la 30 adhesión de células neurales, la supervivencia de neuronas, el crecimiento y regeneración axonal, la estructuración y la conectividad. Los ensayos de cultivo celulares *in vitro* que utilizan fibroblastos humanos han demostrado que una matriz de regeneración producida por filtración con un filtro de 5 µm tiene un efecto inhibitor sobre la proliferación de estas células. La magnitud de tal actividad de inhibición de fibroblastos puede afectarse mediante las condiciones de procesamiento utilizadas para la formación de la matriz de regeneración. Una matriz de regeneración 35 producida a partir de sangre coagulada inhibe la proliferación de fibroblastos más que una matriz de regeneración producida a partir de sangre recogida en presencia de anticoagulantes. En determinadas realizaciones esta diferencia es ventajosa dado que los fibroblastos secretan colágeno en el tejido herido, lo cual es necesario hasta cierto punto para proporcionar una estructura de soporte, pero en la mayoría de los casos de daño tisular grave el defecto principalmente se rellena con una cicatriz de tejido conectivo. La cicatrización de tejido conectivo extensa es 40 inhibidora del proceso de regeneración y contribuye a la pérdida permanente de función en los tejidos y órganos dañados. Por lo tanto, en determinadas realizaciones la magnitud de la actividad de la matriz de regeneración se modula o controla para proporcionar características de cicatrización óptimas a base de la gravedad del daño tisular en el sitio herido.

Utilizando modelos *in vivo* de lesión de médula espinal las matrices de regeneración de la presente invención han demostrado presentar múltiples efectos beneficiosos que incluyen, pero sin limitación, propiedades angiogénicas, crecimiento axonal, tamaño y número de lesiones reducidos, así como una función inhibidora de la formación de cicatrices gliales de astrocitos. *In vivo*, una matriz de regeneración normalmente se degrada a lo largo del tiempo (por ejemplo, habitualmente aproximadamente 4-8 semanas), principalmente por ingestión de macrófagos, aunque 45 las matrices de regeneración de la presente invención no se limitan a tales tiempos o mecanismos de degradación. Como está claro a partir de la presente descripción, tal degradación puede producirse a través de cualquiera una diversidad de mecanismos incluyendo, pero sin limitación, la actividad celular (por ejemplo, a través de la acción de macrófagos), y la degradación mecánica, química, metabólica y/o enzimática. En determinadas realizaciones, tal degradación de la matriz de regeneración estimula a los macrófagos a presentar ellos mismos propiedades regenerativas adicionales (por ejemplo, a través de su transdiferenciación en células de tipo endotelial positivas para 50 el factor von Willebrand). Cuando se implantan en partes de tejidos u órganos dañados, pérdidas o cortadas, las matrices de regeneración de la presente invención sustentan la regeneración y formación de tejido nuevo y ayudan a restablecer la funcionalidad de la parte dañada o pérdida del tejido u órgano. Los ejemplos no limitativos de tejidos en los cuales puede implantarse una matriz de regeneración para iniciar, aumentar, sustentar y/o dirigir la regeneración tisular y formación tisular incluyen partes dañadas, perdidas o cortadas del hígado, riñones, páncreas, 55 corazón, ovarios, glándula tiroideas, cerebro, médula espinal y cualquier otro tejido neural.

En el contexto de la regeneración de la médula espinal, una matriz de regeneración puede implantarse con o sin células tales como, por ejemplo, células madre neurales, células progenitoras neurales y/o células neurales diferenciadas, en la parte dañada, degenerada, perdida o cortada de la médula espinal. La funcionalidad de una

matriz de regeneración puede expandirse y manipularse adicionalmente mediante la adición de uno o más agentes terapéuticos que incluyen, pero sin limitación, factores de crecimiento, citocinas, fármacos y/u otros componentes. En determinadas realizaciones, cuando se produce una matriz de regeneración sin la adición de agentes terapéuticos exógenos se observa una funcionalidad parcial en términos de extensión de prolongaciones neuronales y de regulación positiva de genes neuronales. En tales realizaciones, la magnitud de estas funciones se potencia mediante la incorporación de agentes terapéuticos exógenos durante la formación de una matriz de regeneración. Los ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos adicionales convenientes incluyen factores de crecimiento tales como bFGF, EGF, BDNF y/o NGF. En determinadas realizaciones, el implante de la matriz de regeneración en médulas espinales lesionadas conduce al restablecimiento funcional de la pérdida de la función motora en tan solo 4 semanas después del implante.

La formación de un armazón biológico degradable implantable con propiedades regenerativas inherentes y de múltiples facetas, cuyo armazón está abarcado en determinadas realizaciones de la presente invención, no tiene en absoluto precedentes. Aunque algunos tipos celulares han producido matrices extracelulares simples, tales matrices parecen ser solo de una naturaleza estructural. Nadie ha comunicado hasta ahora la producción de una matriz de autoensamblaje o material de armazón que facilite, sustente y ayude de forma estructural y biológica en la regeneración y el crecimiento de tejido nuevo, cuya matriz o material de soporte está abarcado por determinadas realizaciones de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1. Obtención de la matriz de regeneración a partir de sangre coagulada completa.

La sangre venosa se obtuvo de donantes sanos (Research Blood Components, Brighton, MA) en vacutainers® de 12 ml, se dejó coagular a TA durante al menos 30 min y se congeló a -20 °C hasta su uso. El procesamiento se inició sometiendo a la sangre a 5 ciclos de congelación (-20 °C) - congelación (TA). Los contenidos de los vacutainer que contenían 10 ml de sangre se vaciaron en un mortero estéril. El coágulo se rompió mediante trituración manual utilizando un triturador estéril con la adición de medio de procedimiento que consistía en una mezcla 1:1 de DMEM (Mediatech, Herndon, VA) y F12 de Ham (Mediatech), complementada con complemento ITS 2X (Gibco/Invitrogen, Gaithersburg, MD), EGF humano recombinante (R&D Systems, Minneapolis, MN) 20 ng/ml y bFGF humano recombinante (R&D Systems) 40 ng/ml. Durante el procedimiento de trituración se aspiró del mortero el líquido que contenía la sangre completa licuada y medio de procedimiento utilizando una pipeta serológica estéril de 25 ml, y se transfirió a un filtro de malla de 40 µm en donde se dejó que los contenidos filtren por gravedad en un tubo de centrifuga cónico de 50 ml estéril. Se añadió medio de procedimiento recién preparado al coágulo sólido restante, y el procedimiento se repitió hasta que se licuó el coágulo completo y se alcanzó un volumen final de 200 ml. Los tubos se centrifugaron a 500 xg durante 30 min y el sobrenadante se filtró a través de un filtro de jeringa de 5 µm (Pall/Gelman) de forma directa sobre los casetes Opticell®. Los casetes Opticell® se incubaron a 37 °C y CO₂ al 7,5 %. Después de 6 a 8 días de incubación, se añadieron 3 ml de medio de procedimiento recién preparado a cada casete Opticell®. Después de eso se añadieron 1,5 ml de medio de procedimiento recién preparado en días alternos hasta que la matriz de regeneración se recogió para análisis adicionales. La matriz de regeneración formada utilizando este procedimiento tiene propiedades adhesivas en el sentido que debe recogerse retirando la membrana superior del casete Opticell® y rasparse de la parte inferior de la membrana.

Ejemplo 2. Obtención de la matriz de regeneración a partir de sangre completa recolectada utilizando anticoagulante.

Se obtuvo sangre venosa a partir de donantes sanos (Research Blood Components, Brighton, MA) en vacutainers® de 12 ml que contenían Na₄-EDTA y se congeló a -20 °C hasta su uso. El procesamiento se inició sometiendo la sangre a 5 ciclos sucesivos de congelación (-20 °C) - descongelación (TA). Los contenidos del vacutainer que contenía 10 ml de sangre se vaciaron en un recipiente estéril y se añadió medio de procedimiento (véase el Ejemplo 1) hasta un volumen final de 200 ml y la solución se mezcló suavemente. Este material de partida se filtró por gravedad a través de un tamiz de malla de 40 µm. El filtrado se recogió y se centrifugó a 500 xg durante 30 min y el sobrenadante se pasó a través de un filtro de jeringa de 5 µm de forma directa en los casetes Opticell®, hasta 10 ml cada uno. Los casetes Opticell® se incubaron a 37 °C y CO₂ al 7,5 % en aire. Después de 6 a 8 días de incubación, se añadieron 3 ml de medio de procedimiento recién preparado a cada casete Opticell®. Después de esto, se añadieron 1,5 ml de medio de procedimiento recién preparado en días alternos hasta que la matriz de regeneración se recogió para análisis adicionales.

En otro experimento se obtuvo sangre venosa de donantes sanos (Research Blood Components, Brighton, MA) en vacutainers® de 12 ml que contenían Na₄-EDTA y se mantuvo en hielo. Los contenidos del vacutainer que contenía 10 ml de sangre se vaciaron en un recipiente estéril y se añadió medio de procedimiento (véase el Ejemplo 1) hasta un volumen final de 200 ml y la solución se mezcló suavemente. Este material de partida se filtró a través de filtros de jeringa de 5 µm. El filtrado se recogió y se centrifugó a 500 xg durante 30 min, y el sobrenadante se pasó a través de un filtro de jeringa de 5 µm de forma directa en los casetes Opticell® hasta 10 ml cada uno. Los casetes Opticell® se incubaron a 37 °C y CO₂ al 7,5 %. Después de 6 a 8 días de incubación se añadieron 3 ml de medio de procedimiento recién preparado a cada casete Opticell®. Después de esto se añadieron 1,5 ml de medio de procedimiento recién preparado en días alternos hasta que la matriz de regeneración se recogió para el análisis

adicional.

La matriz de regeneración formada utilizando estos procedimientos tiene propiedades adhesivas débiles y puede recogerse mediante aspiración a través de una aguja de calibre 18, utilizando una de los orificios de acceso del casete Opticell®.

5 **Ejemplo 3. Obtención de la matriz de regeneración a partir de fracciones de sangre completa producidas utilizando una filtración en serie.**

La actividad de la matriz de regeneración se mejoró adicionalmente pasando el sobrenadante de la etapa de centrifugación (como se enumera en los Ejemplos 1 y 2) a través de conjuntos de filtros de 5 µm y 1,2 µm acoplados juntos. Esta etapa elimina partículas más grandes del material de partida, lo que da como resultado propiedades
10 funcionales modificadas. Se muestra un ejemplo de la estructura de la matriz de regeneración dentro del casete Opticell® (Figura 3). La Figura 4 muestra que una matriz de regeneración producida a partir de sangre completa no muestra ningún indicio de células o núcleos intactos. La tinción de hematoxilina fue completamente negativa en todos los cortes analizados, pero el material se tiñe de forma fuerte con eosina. Cuando se utilizan lentes de alta
15 apertura (alta resolución) puede resolverse de forma clara una estructura en forma de perlas. Además de la estructura en forma de perlas que comprende la mayoría de la matriz de regeneración, es posible observar pequeñas regiones de láminas planas que parecen estar compuestas de estructuras más compactas.

Ejemplo 4.1. Microscopía electrónica de barrido (MEB) de la matriz de regeneración.

Para la microscopía electrónica se fijó una matriz de regeneración producida mediante los procedimientos descritos en los Ejemplos 1, 2 y 3 con glutaraldehído al 2,5 % en tampón cacodilato de sodio 0,1 M (Electron Microscopy
20 Sciences) a 4 °C durante 16 h. Las fijaciones se hicieron de forma directa en el Opticell® sustituyendo el medio de cultivo con 10 ml de solución fijadora. El siguiente día el fijador se retiró y se añadió PBS (10 ml) al Opticell®. El Opticell® se abrió con un bisturí y la membrana Opticell® con la matriz de regeneración unida a ella se cortó en pequeños trozos de 0,5x1 cm. Estos trozos se pusieron en un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml y se fijaron posteriormente con tetróxido de osmio al 1 % en agua durante 2 h. La mezcla se puso inmediatamente después en una solución de etanol al 50 % durante 2 min y se deshidrató en serie en soluciones de etanol al 70, 80, 90, 95 y
25 100 %. Después de la última etapa de etanol las muestras se mantuvieron a -20 °C hasta su envío a las instalaciones del Centro de microscopía central de la Universidad de Massachusetts Amherst. Las muestras se secaron por punto crítico y se recubrieron con metalizado por bombardeo atómico. Se tomaron imágenes de las muestras con un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-5400 a aumentos de 100x a 7500x. Las imágenes se tomaron a través de una interfaz digital en un ordenador y se exportaron en formato TIFF, con una resolución de
30 640x480 píxeles.

Cada uno de los procedimientos de preparación produjo una matriz de regeneración con una microestructura distinta (Figuras 5, 6 y 7). La filtración de porosidad menor produjo una morfología global similar, sin embargo el tamaño de las esferas fue menor para el tratamiento por 1,2 µm (diámetro de 1-2 µm, Figura 6) que el del tratamiento por
35 5,0 µm (diámetro de 2-3 µm, Figura 5). Una matriz de regeneración producida utilizando sangre coagulada pasó una fase de maduración de aproximadamente 2 a 3 semanas de incubación, en la que la superficie superior de la matriz tenía un aspecto de estructura ondulada. Una matriz de regeneración producida con sangre no coagulada no desarrolla este aspecto, sin embargo las estructuras esféricas se agregan juntas para formar una estructura continua que tiene fibras de aproximadamente 100 nm intercaladas por todas partes (Figura 7).

Para la histología la matriz de regeneración se fijó con glutaraldehído al 2,5 % en tampón cacodilato de sodio 0,1 M (Electron Microscopy Sciences) a 4 °C durante 16 horas. Las fijaciones se realizaron de forma directa en el Opticell® sustituyendo el medio de cultivo con 10 ml de solución fijadora. El siguiente día la solución fijadora se retiró y se
40 añadió PBS (10 ml) al Opticell®. El Opticell® se abrió con un bisturí y la membrana Opticell® con la matriz de regeneración unida a ella se cortó en pequeños trozos de 2x2 cm, y se montó entre esponjas en un casete de histología de tejidos. Las muestras se pusieron en etanol al 70 % y se enviaron para el procesamiento histológico convencional por parte de Mass Histology (Worcester, MA). Las muestras se deshidrataron en series de etanol, se incluyeron en parafina, se orientaron y se realizaron cortes. Los cortes se tiñeron con hematoxilina eosina utilizando condiciones de fijación convencionales. Se tomaron imágenes con ópticas de campo oscuro utilizando un
45 microscopio Leica modificado optimizado con las tecnologías Richardson para la potenciación del contraste y la reducción de la interferencia. Las imágenes se recogieron con una cámara de video con una resolución de 640x480 píxeles, con 20, 40 y 100x. Se muestra una imagen de muestra recogida con un aumento de 100x (Figura 8). La matriz de regeneración se tiñe con eosina y no con hematoxilina.
50

Ejemplo 4.2. Microscopía electrónica de transmisión (MET) de la matriz de regeneración.

Se cortó y se exploró mediante MET una matriz de regeneración de 21 días preparada a partir de una muestra de
55 tejido que se pasó a través de un filtro de 5 µm (Figuras 9-11). El análisis por MET revela que las partículas similares a esferas son parte de un material continuo dado que en el MET no muestran límites entre ellas. Las esferas son sólidas y no huecas, y no tienen una membrana o cualquier otro tipo de estructura que las rodee. El interior de este material es homogéneo. Los puntos muy oscuros en la Figura 9 son fondo de la tinción.

Ejemplo 5. Caracterización bioquímica de la matriz de regeneración.

Las matrices de regeneración fabricadas de sangre completa se analizaron para el contenido de proteínas, lípidos, ácidos nucleicos e hidratos de carbono, y para las actividades metabólicas como un indicador sensible de la presencia de células viables. Los datos biológicos se normalizaron con respecto a la masa en gramos de la matriz de regeneración húmeda analizada. Se utilizaron procedimientos convencionales para la cuantificación de proteínas, ADN, ARN y lípidos, y se determinó en múltiples puntos de tiempo la composición de varios lotes distintos de la matriz de regeneración en el procedimiento de fabricación de la matriz de regeneración (se proporcionan procedimientos detallados en las secciones individuales).

5.1. Contenido de proteína total de la matriz de regeneración

El constituyente biológico más abundante de la matriz de regeneración son las proteínas, estando representadas al $8,8 \pm 1,2$ % en masa, con la masa restante siendo líquido asociado a la matriz de regeneración. El contenido de proteína normalizado en la matriz de regeneración se determinó solubilizando una alícuota pesada previamente de una matriz de regeneración en tampón de lisis de SDS (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 10 mM, SDS al 1 % y coctel inhibidor de proteasas Complete® mini (n.º de Cat. 11-836-153, Roche). La concentración de proteína en el lisado se determinó utilizando un kit de ensayo de proteínas basado en Lowry (n.º de Cat. 500-0112, Bio-Rad) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se construyó una curva patrón utilizando un patrón de BSA (n.º de Cat. 500-0007, Bio-Rad). Se midió la densidad óptica (750 nm) utilizando un espectrofotómetro Spectramax Plus (Modelo 384, Molecular Devices) y la concentración de proteínas de la muestra se determinó mediante interpolación del intervalo lineal de la curva patrón utilizando el programa informático Softmax Pro (Molecular Devices).

El contenido de proteína total (por matriz de regeneración) se determinó para el material de partida (0) de la matriz de regeneración, para las muestras recogidas en los días 0, 15 y 21 de la siembra inicial de los casetes Opticell®.

Tabla 1. Contenido de proteína total de la matriz de regeneración en el casete Opticell®.

El líquido de producción de la matriz de regeneración se retiró y la matriz de regeneración se solubilizó en tampón de SDS, y se determinó el contenido de proteína total. Para cada punto de tiempo se tomaron muestras de 4 casetes Opticell® y se analizaron. Los resultados procedentes de 4 lotes independientes de producción de matriz de regeneración se presentan como la media \pm la desviación típica.

Punto de tiempo (días)	Contenido de proteínas (mg)
0	80 ± 25
15	49 ± 7
21	51 ± 12

5.2. Análisis por SDS Page de la matriz de regeneración.

Las especies principales de las proteínas presentes en la matriz de regeneración se determinaron mediante espectroscopia de masas en todas las bandas de Coomassie visibles extraídas de un gel de SDS-PAGE reductor. Para la SDS-PAGE, las muestras se prepararon y se cuantificaron como se indica anteriormente y se cargaron en geles en gradiente de poliacrilamida profundos (PAGE en gradiente al 4-20 %, n.º de Cat 345-0033, Bio-Rad) a 10 μ g por pocillo. Las bandas de proteína principales se visualizaron mediante tinción con tinte de gel Simply Blue® (n.º de Cat. LC6060, Invitrogen).

Las bandas de proteína extraídas se enviaron a Midwest Bio Services (Overland Park, KS (www.midwestbioservices.com)) para la identificación. En resumen; la reducción, alquilación y la tripsinización en el gel se continuó por la extracción de péptidos y la separación en una columna microcapilar de fase inversa. Los péptidos se eluyeron y se electropulverizaron de forma directa en un espectrómetro de masas de atrapamiento de iones LCQ Deca XP Plus. Se adquirieron los espectros de MS completos, así como los espectros de MS/MS, y los datos se analizaron mediante el programa informático TurboSEQUENT. Dado que este tipo de análisis utiliza la masa de los péptidos para dar una referencia con respecto al peso molecular conocido de fragmentos peptídicos de proteínas conocidas, la presencia de proteínas parcialmente degradadas también se detectaría en las bandas del gel. Las especies de proteína principales identificadas en la matriz de regeneración se enumeran a continuación: transferrina, seroalbúmina, precursor de seroalbúmina, componente del complemento 3, hemoglobina cadenas A-D, IgM, IgG1, inhibidor de la medulasa 2, anhídrido carbónico y proteína CA1.

Se observó un patrón de bandeo de proteína consistente en las muestras procedentes de todos los lotes (51-56) tanto el día 15 como el día 21. La mayor parte de la proteína se resolvió a pesos moleculares bajos (aproximadamente 67 % <10 KDa), aproximadamente el 15 % en 33 KDa y aproximadamente el 19 % restante en pesos moleculares de entre 34 y 103 KDa. En la Figura 12 se muestra una fotografía del gel de SDS.

5.3. Contenido de ácidos nucleicos de la matriz de regeneración.

El ADN se purificó y cuantificó de la matriz de regeneración (M) y se comparó con el material inicial (O) para los puntos de tiempo 0, 15, 21, así como para las proteínas. Una cantidad medida de muestra se lisó utilizando tampón de lisis de SDS/proteinasa K 2X (Tris-HCl 40 mM [pH 8,0], EDTA 50 mM, NaCl 200 mM, SDS al 2 % y 6 µl de solución madre de proteinasa K (20 mg/ml, n.º de Cat. 25530-049, Invitrogen) y se incubó durante una noche a 50 °C. El lisado se extrajo con un volumen equivalente de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico saturado con Tris-HCl (PCI, 25:24:1, pH 8,0), una gota de Phase Lock Gel ((PLG, n.º de Cat. 955 15 403-7, Eppendorf). Las muestras se centrifugaron a 14.000 g durante 10 min a 4 °C para separar las fases. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo de microcentrifuga de 2,0 ml con PLG y se repitieron la extracción y la centrifugación. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo de microcentrifuga de 2,0 ml con PLG y se extrajo con un volumen equivalente de cloroformo y se centrifugó a 12.000 xg durante 10 minutos a 4 °C. La fase acuosa se transfirió a un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml limpio y el ADN se precipitó añadiendo 0,7 volúmenes de isopropanol (n.º de Cat. 3032-06, Mallinckrodt) y 10 µg de glucógeno (n.º de Cat. 10901393001, Roche) y se dejó reposar a TA durante 15 min. Las muestras se centrifugaron durante 20 minutos a 14.000 x g a 4 °C. Los sedimentos se lavaron 2X con 0,5 ml de etanol al 70 % (n.º de Cat. EX0289-1, EM Science), se secaron al aire y se resuspendieron en 30 µl de tampón TE, pH 8,0. La concentración de ADN se determinó por medición espectrofotométrica (Spectra Max Plus, Modelo 384, Molecular Devices) de la densidad óptica (DO) a 260 nm. También se determinó la proporción DO 260/280 para indicar el nivel de contaminación por proteínas en el aislamiento del ADN. Se comparó el contenido de ADN total (µg) de la matriz de regeneración en los días 15 y 21 con el del material de partida en el tiempo 0.

20 *Tabla 2. Contenido de ADN total de la matriz de regeneración en el casete Opticell®.*

Se retiró el líquido de producción de la matriz de regeneración y la matriz de regeneración R se solubilizó en tampón de SDS y se determinó el contenido de ADN total. Para cada punto de tiempo, se tomaron muestras de 4 casetes Opticell® y se analizaron. Los resultados procedentes de 4 lotes independientes de la producción de matriz de regeneración se presentan como la media ± la desviación típica.

Punto de tiempo (días)	Contenido de ADN (µg)
0	8 ± 18
15	7,8 ± 2,0
21	6,6 ± 3,3

Se aisló ARN de la matriz de regeneración (M) y se comparó con el del material de partida (O) para los puntos de tiempo 0, 15 y 21 utilizando el reactivo Trizol (n.º de Cat. 15596-018, Invitrogen). Se añadió 1,0 ml de Trizol a una masa de cantidad predeterminada y se dejó en reposo a TA hasta que se solubilizó (10-20 min). Las muestras se centrifugaron a 12.000 x g durante 10 minutos a 4 °C y la capa acuosa se transfirió a un nuevo tubo de microcentrifuga de 1,5 ml. La solución se extrajo con 200 µl de cloroformo (n.º de Cat. 4440-04, Mallinckrodt) y se centrifugó a 12.000 x g durante 20 minutos a 4 °C. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo de microcentrifuga de 1,5 ml y se precipitó el ARN añadiendo 500 µl de alcohol isopropílico (n.º de Cat. 3032-06, Mallinckrodt) y centrifugando a 12.000 x g durante 30 minutos a 4 °C. El sedimento de ARN se lavó en etanol al 75 %, se centrifugó a 7.500 x g durante 5 minutos a 4 °C, se secó al aire y se resuspendió en 25 µl de agua sin ARNasa calentando la muestra a 65 °C durante 15 min. El ARN se cuantificó por DO a 260 nm utilizando un espectrofotómetro (Spectramax, Modelo 384, Molecular Devices). El contenido de ARN total (µg) de la matriz de regeneración en los días 15 y 21 se comparó con el del material de partida de la matriz de regeneración en el tiempo 0.

35 *Tabla 3. Contenido de ARN total de la matriz de regeneración en el casete Opticell®.*

Se retiró el líquido de producción de la matriz de regeneración y la matriz de regeneración se solubilizó en tampón SDS y se determinó el contenido de ARN total. Para cada punto de tiempo, se tomaron muestras de 4 casetes de Opticell® y se analizaron. Los resultados de 4 lotes independientes de la producción de matriz de regeneración se presentan como la media ± la desviación típica.

Punto de tiempo (días)	Contenido de ARN (µg)
0	1551 ± 1145
15	184 ± 29
21	96 ± 43

5.4. Contenido de lípidos de la matriz de regeneración.

El contenido de lípidos total en la matriz de regeneración (M) se comparó con el del material de partida (O) para los puntos de tiempo 0, 15 y 21 utilizando el procedimiento de Bligh y Dyer (Bligh, E. G., y Dyer, W. J., A rapid method of total lipid extraction and purification, Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917, 1959). Antes del análisis, las muestras se almacenaron congeladas a -85 °C y se descongelaron a TA en el momento del análisis. Para la matriz de regeneración, se añadieron 375 µl de metanol:cloroformo (2:1 v/v) a la mezcla prepesada y esta se incubó a TA durante 15 min en un agitador vorticial (mini agitador vorticial digital, n.º de Cat. 14005-824, VWR) a velocidad media). Después, se añadieron 475 µl de mezcla de metanol:cloroformo:agua (n.º de Cat. IB05174, IBI Shelton) y se incubó 15 minutos a TA en un agitador vorticial como se ha indicado anteriormente. Las muestras se centrifugaron a 250 x g durante 10 minutos a TA. La fase líquida (tanto la fase de cloroformo como la de agua) se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml limpio dejando solo el sedimento de la matriz de regeneración en el tubo. El sedimento de la matriz de regeneración se resuspendió en 475 µl de mezcla de metanol:cloroformo:agua 2:1:0,8 y se extrajo otra vez mediante agitación vorticial durante 15 minutos a velocidad media. Se añadieron 125 µl de cloroformo y las muestras se sometieron a agitación vorticial durante 2 minutos, se añadieron 125 µl de agua y las mezclas se sometieron a agitación vorticial durante otros 2 minutos, y después se centrifugó a 250 x g durante 10 minutos a TA. La fase líquida se agrupó con la muestra procedente de la extracción original y se centrifugó a 1.000 x g durante 10 minutos a TA. La fase de cloroformo se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml limpio y se secó en un desecador al vacío durante 45 minutos o hasta que el cloroformo se evaporó de forma completa. Se añadieron 50 µl de cloroformo al sedimento de lípidos seco y las muestras se sometieron a agitación vorticial durante 15 min para solubilizar los lípidos de forma completa. Las muestras se almacenaron a -85 °C hasta el análisis final. Se construyó una serie de diluciones de lípidos patrón (L4646, Sigma) y las muestras se hidrolizaron añadiendo 10 µl de la muestra de lípidos extraídos a 500 µl de ácido sulfúrico concentrado (n.º de Cat. SX1244-6, EMD Chemicals) y llevando a ebullición los tubos durante 10 min. Las muestras se enfriaron en un baño de agua a TA durante 2 min y se añadieron 40 µl de muestra a 600 µl de reactivo fósforo-vanílico (0,6 g de vanilina (n.º de Cat. VX0045-1, EM Science), 10 ml de etanol al 100 % (n.º de Cat. EX0289-1, EM Science), 90 ml de H₂O y 400 ml de ácido fosfórico (n.º de Cat. PX0995-6, EMD Chemicals), se mezcló y se incubó a TA con protección frente a la luz durante 45 min. Se determinó la concentración de lípidos midiendo la DO a 525 nm (Spectra Max 384, Molecular Devices) y la interpolación con la curva patrón utilizando el programa informático SoftMax proporcionado con el espectrofotómetro. El contenido de lípidos total (µg) de la matriz de regeneración en los días 15 y 21 se comparó con el del material de partida en el tiempo 0.

Tabla 4. Contenido de lípidos total de la matriz de regeneración en el casete Opticell®.

Se retiró el líquido de producción de la matriz de regeneración y el contenido de lípidos total de la matriz de regeneración se determinó como se ha indicado anteriormente. Para cada punto de tiempo, se tomaron muestras de 4 casetes Opticell® y se analizaron. Los resultados de 4 lotes independientes de producción de la matriz de regeneración se presentan como la media ± la desviación típica.

Punto de tiempo (días)	Contenido de lípidos (µg)
0	1,9 ± 0,4
15	0,02 ± 0,01
21	0,03 ± 0,01

Los resultados de los análisis para los ácidos nucleicos y los lípidos sugieren que estos materiales están presentes en el material de partida y que se degradan a lo largo del tiempo. La tasa de degradación inicial parece ser variable con el alto grado de variación en la cantidad de ADN y ARN detectado en el material de partida en el tiempo cero. Esta variabilidad entre muestras distintas disminuye con el tiempo en los días 15 y 21. En ningún caso hubo un aumento de ninguno de estos componentes, lo que proporciona una evidencia adicional de que no está presente actividad celular.

Ejemplo 5.5. Sustrato radiomarcado para la síntesis de proteína y ácidos nucleicos durante la formación de la matriz de regeneración.

Para establecer si la formación de la matriz de regeneración implica procesos celulares básicos activos (síntesis de ADN, ARN y proteínas), se incubó el material de partida de la matriz de regeneración con sustratos tritiados para la síntesis de ADN, ARN y proteínas. Se incubaron cinco Opticells® que contenían material de partida con sustratos marcados con radioisótopo, un Opticell® para cada sustrato. Los sustratos utilizados fueron mezcla de ³H-L-aminoácidos (1 mCi/ml, Cat. 20063, MP Biomedicals), ³H-dTTP (10-20 Ci/mmol, n.º de Cat. 24044, MP Biomedical), ³H-Timidina (60-90 Ci/mmol, n.º de Cat. 24060 MP Biomedicals), ³H-UTP (35-50 Ci/mmol, n.º de Cat. 24061, MP Biomedicals) y ³H-Uridina (35-50 Ci/mmol, n.º de Cat. 24046, MP Biomedicals). Para la introducción en los casetes de Opticell®, se diluyeron 25 µl de isótopo en 0,5 ml de medio DMEM:F-12, después se inyectó en cada Opticell® y se rotó para facilitar la mezcla. Inmediatamente después de la inyección y la mezcla, se tomó una alícuota de 1,0 ml del Opticell® (volumen total de 10 ml) y se procesó para un control de tiempo cero (véase a continuación). Los

Opticell® se incubaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5,0 % en aire. En los tiempos de 1, 3 y 7 días, se tomaron alícuotas de 1,0 ml para el análisis. Las muestras se mantuvieron en hielo en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml y se añadieron 100 µl (0,1 vol) de ácido tricloroacético al 100 % y los tubos se invirtieron para mezclar los contenidos. Las muestras se incubaron en hielo durante 20 min para precipitar los ácidos nucleicos y las proteínas. El precipitado se añadió a un filtro GF/C (Whatman) en TCA al 0,1 % (enfriado en hielo) utilizando una pipeta Pasteur. El contenido del tubo de microcentrífuga se añadió al filtro y se aclaró 5X utilizando TCA al 0,1 % enfriado en hielo. Los filtros se pusieron sobre papel de aluminio y se secaron al aire durante una hora. El filtro se puso en 4 ml de Coctel de Centelleo (ScintiSafe, Fisher Scientific) y se añadió a un vial de centelleo de plástico de 5 ml. Los viales se recontaron utilizando un contador de centelleo líquido Beckman en el canal de energía del tritio durante un minuto. Los resultados (cuentas por minuto) del material precipitable por TCA se presentan en la tabla mostrada a continuación. Como control positivo para el ensayo, se utilizaron fibroblastos humanos cultivados.

Tabla 5. Cuentas totales por minuto para cada uno de los sustratos radiomarcados en el tiempo cero, 1 día, 3 días y una semana después de la siembra inicial del material de formación de matriz de regeneración.

Tiempo		ADN ³ H-TTP	ADN ³ H-Timidina	ARN ³ H-UTP	ARN ³ H-Uridina	Proteína Mezcla de ³ H-AA
Total		250.781	248.971	252.367	253.674	249.875
Material de siembra de la matriz de regeneración	0 h	103	113	127	115	95
	1 día	236	277	356	387	499
	3 días	301	286	346	354	524
	1 semana	289	275	321	289	426
Fibroblastos humanos	0 h	526	487	512	426	458
	1 día	14.643	12.473	27.943	25.784	69.285

Estos resultados indican que no hay actividad celular detectable durante el procedimiento de formación de la matriz de regeneración.

Ejemplo 5.6. Estudios de inhibición metabólica.

En el primer conjunto de experimentos (véanse las Figuras 13 y 14), para inhibir la actividad de la ADN polimerasa, de la ARN polimerasa II y de la síntesis de proteínas, se utilizaron afidicolina (disuelta en DMSO, concentración final 10 µg/ml), α-amanitina (disuelta en agua, concentración final 10 µg/ml) y ciclohexamida (disuelta en etanol, concentración final de 10 µg/ml), respectivamente, en la matriz de regeneración producida a partir de sangre completa. Los inhibidores se añadieron en el día 0 al Opticell®, en el día de la primera alimentación (día 5 o 6). A partir de ahí, los cultivos se alimentaron con medios regulares. Las muestras procedentes de los respectivos tratamientos y controles se recogieron el día 21 y se analizaron.

Los resultados de estos estudios de inhibición se presentan en las Figuras 13-16. Los cultivos de fibroblastos de control que contenían α-amanitina 0, 10, 30 y 100 nM se cultivaron durante una semana. Los fibroblastos sin α-amanitina añadida estaban confluentes el día 7. Los cultivos que contenían α-amanitina 10, 30 y 100 nM presentaron una mortalidad de aproximadamente 60-70 %, 80-90 % y 100 % respectivamente el día 7.

En otro conjunto de experimentos, la adición de apirasa (disuelta en agua, concentración final 10 µg/ml), una ATPasa/ADPasa, indicó que esta tenía la capacidad de prevenir de forma parcial la formación de matriz en muestras de filtro de 5 µm. La apirasa tiene dos funciones: por un lado tiene actividad ATPasa/ADPasa y, por el otro, tiene actividad anticoagulante. Es posible que los componentes presentes en muestras filtradas por 5 µm sean susceptibles a la actividad anticoagulante de la apirasa dando como resultado la "sedimentación" observada en esos cultivos. La ausencia de "sedimentación" en las muestras filtradas por 1 µm se debe posiblemente a la eliminación de estos componentes retenidos por el tamaño de poro pequeño del filtro.

Ejemplo 5.7. Análisis de ácidos grasos.

Se realizaron análisis de espectrometría de masas para determinar el contenido de ácidos grasos en cultivos de matriz de regeneración de 3 semanas preparados a partir de sangre completa que se había filtrado a través de un filtro de 5 µm o 1 µm. Como puede observarse en la Tabla 6, varias de las especies de ácidos grasos detectadas estaban ausentes en el sobrenadante y presentes de forma exclusiva en la matriz. La proporción de ácido graso por mg de lípido era mayor en la muestra filtrada por 1 µm en comparación con la filtrada por 5 µm para la matriz. Esta proporción se invirtió para el sobrenadante. Debido a que los datos presentados se basan solo en una muestra y en un análisis, no se pudo extraer una conclusión en esta fase.

Tabla 6. Resultados del análisis de ácidos grasos en la matriz de regeneración de 3 semanas (preparada a partir de sangre completa) y el sobrenadante por partición de Folch, representado como $\mu\text{g}/\text{mg}$ de lípido.

Estructura	Nombre	Matriz		Sobrenadante	
		Filtrado por 5 μ	Filtrado por 1 μ	002S	003S
14:0	Ácido mirístico	16,32	24,80	1,69	--
15:0	Ácido pentodecíclico	1,27	3,19	0,81	0,03
16:0	Ácido palmítico	29,33	82,65	7,82	0,44
16:1	Ácido palmitoleico	1,62	18,92	--	--
17:0	Ácido margárico	1,64	2,38	0,56	0,29
18:0	Ácido esteárico	15,24	44,00	1,76	--
18:1	Ácido oleico	15,21	38,38	4,75	0,69
18:2	Ácido α -linoleico	3,41	10,40	1,62	0,38
18:3	Ácido α -linolénico	1,44	--	--	0,08
20:0	Ácido araquídico	0,5	1,34	--	--
20:1	Ácido gadoleico	0,48	0,75	--	--
20:4	Ácido araquidónico	--	3,02	--	--
21:0	Ácido heneicosanoide	--	0,17	--	--
22:0	Ácido behénico	0,81	2,10	--	--
22:6	Ácido nisínico	1,79	2,49	--	--
23:0	Ácido tricosanoico	0,31	0,84	0,58	--
24:0	Ácido tetracosanoico	1,76	5,14	--	--
24:1	Ácido nervónico	1,20	3,76	--	--
	Ácidos grasos totales en la muestra	92,13 $\mu\text{g}/\text{mg}$	244,33 $\mu\text{g}/\text{mg}$	19,59 $\mu\text{g}/\text{mg}$	1,92 $\mu\text{g}/\text{mg}$

Ejemplo 5.8. Osmolaridad.

- 5 Se analizó la osmolaridad de muestras congeladas procedentes de sobrenadantes de dos cultivos distintos para distintos períodos de tiempo. Es obvio a partir de la Tabla 7 mostrada a continuación que hay un espectacular aumento de la osmolaridad a medida que los cultivos envejecen.

Tabla 7. Mediciones de la osmolaridad de los cultivos de la matriz de regeneración.

ID de la Muestra	Tiempo 0	14 días	21 días	28 días	42 días	56 días
1	314	--	420	437	532	528
2	311	406	440	--	--	--

10 Ejemplo 5.9. Análisis de la matriz de regeneración para la actividad metabólica dirigida por ATP.

- 15 Se ensayaron los niveles de adenosina trifosfato (ATP) de la matriz de regeneración y del líquido de producción asociado a las 2, 3, 4, 6 y 8 semanas y se compararon estos niveles con los niveles de ATP en el material de partida. Se utilizó el sistema de ensayo de ATP ENLITEN para la detección rápida y cuantitativa de la ATP por luminiscencia. El material se extrajo con SDS y se precipitó con TCA, según sugiere el fabricante. Además, se examinó la presencia de varias enzimas metabólicas en las mismas muestras utilizando transferencia de Western. Para el nivel ATP, las reacciones de detección se realizaron por triplicado y se ensayaron en tres días distintos. El material de partida de tres lotes de matriz de regeneración contenía cantidades picomolares (1×10^{-12} mol) de ATP, mientras que el ATP se hizo indetectable en el día seis de cultivo y se mantuvo indetectable durante todos los

puntos de tiempo del cultivo posteriores.

Utilizando transferencia de Western se evaluó la presencia de las enzimas metabólicas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, aldolasa, piruvato deshidrogenasa y citocromo reductasa. La aldolasa, una enzima que cataliza la degradación de glucosa a través de glucólisis, estaba presente en el material de partida y se detectó a niveles decrecientes entre los días 21 y 28 días de incubación y no fue detectable a los 60 días. La glucosa-6 fosfato deshidrogenasa (ruta de las pentosas fosfato) se detectó en el material de partida y se detectó a lo largo del tiempo de forma predominante en el líquido de producción asociado con la matriz de regeneración. Los niveles en la matriz de regeneración cayeron hacia el día 28 y se mantuvieron bajos durante el resto del cultivo. Sin embargo, la banda en el gel para esta enzima fue de un peso molecular inferior, lo que sugirió que solo se detectó una forma degradada. La piruvato deshidrogenasa (ciclo de Krebs) fue detectable en el material de partida a niveles que no parecían cambiar hasta el día 28. Otra vez, la banda tuvo un peso molecular inferior que el predicho, lo que sugirió que se estaba detectando un producto de degradación. Esta enzima no pudo detectarse en ninguno los puntos de tiempo posteriores. La citocromo reductasa (fosforilación oxidativa) se detectó en el material de partida y se reconoció una proteína de migración más rápida (ausente en el material de partida) en todos los puntos de tiempo posteriores, lo que sugirió que se estaba detectando un producto de degradación en la matriz de regeneración.

La ausencia de niveles detectables de ATP en la matriz de regeneración ya a los 6 días después de la siembra inicial avala la conclusión de que estas enzimas no son funcionales. Tanto la piruvato deshidrogenasa como la citocromo reductasa catalizan reacciones que producen cantidades masivas de ATP (36 ATP por reacción).

Ejemplo 5.10. Otros análisis.

El análisis composicional de la matriz indica que no hay indicios de actividad metabólica celular en la matriz de regeneración. El pH del medio de cultivo permanece constante a lo largo de todo el cultivo, indicando de este modo una actividad metabólica muy baja o nula. Además, la osmolaridad del medio de cultivo aumenta de forma espectacular durante el período de cultivo haciendo las condiciones no permisivas para el crecimiento celular.

Una comparación de los geles de SDS-PAGE teñidos por Coomassie reveló pequeñas diferencias en los patrones de bandas entre las muestras filtradas por 5 µm y 1 µm. Las imágenes de los geles se presentan en la Figura 17. Las designaciones de la banda en azul representan bandas que se identificaron de forma previa mediante espectrometría de masas. Las bandas nuevas indicadas por el círculo rojo (M7 y M8) son bandas que solo se han observado en la matriz filtrada por 1 µm. El aspecto de estas bandas puede deberse al enriquecimiento de determinadas bandas resultantes de la eliminación de otras proteínas.

Se analizó la sensibilidad de la matriz de regeneración a distintas proteasas y nucleasas. Las nucleasas tales como ADNasa y ARNasa no tuvieron ningún efecto sobre la matriz de regeneración. Las enzimas proteolíticas tales como pepsina, tripsina, papaína y proteinasa K tuvieron la capacidad de digerir la matriz.

Ejemplo 6. Activación de genes neurotróficos *in vitro* utilizando la matriz de regeneración

Se utilizaron células de neuroblastoma humano (Línea Celular SH-SY5Y, n.º de Cat. CRL-2266, Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA) para caracterizar la actividad neurotrófica de la matriz de regeneración. Las células se cultivaron utilizando el siguiente medio basal (MB): DMEM:F12 (n.º de Cat. 30-2006, ATCC) complementado con SFT al 10 % (n.º de Cat. 26140-079, Invitrogen) y antibiótico Gentamicina 5 µg/ml (n.º de Cat. 15710064, Invitrogen) y se amplificaron y mantuvieron de forma rutinaria mediante el pase en la confluencia utilizando matraces de cultivo de tejidos T125.

Para el análisis de la inducción de genes, las células se tripsinizaron y se sembraron en matraces T75 a 10⁵ células/ml, 3 días antes de la adición del material de partida. Los materiales analizados fueron medio basal (MB), medio de matriz (R), material de partida de OptiCell® (O) y matriz de regeneración (M). Para inactivar el material de prueba líquido, el material de partida OptiCell® (O) se puso en tubos de cultivo de poliestireno cónicos de 15 ml y se calentó a 60 °C durante 30 min. Para inactivar la matriz de regeneración, el líquido asociado a la matriz de regeneración se retiró del OptiCell® y la matriz de regeneración se lavó tres veces (con 10 ml cada vez) con PBS (n.º de Cat. 21-030-CM, Mediatech). Se añadieron 10 ml de formalina (formaldehído al 3,7 %, n.º de Cat. 2106-01, JT Baker en PBS) al OptiCell® que contenía la matriz de regeneración y se incubó durante 30 minutos. La matriz de regeneración se lavó 3X con PBS y se almacenó en PBS hasta que se recogió para los experimentos.

Para los tratamientos de la matriz de regeneración (activa o fijada), los contenidos completos del OptiCell® se añadieron a un matraz de cultivo T75 que contenía células de neuroblastoma SH-SY5Y confluentes al 70 %. Después de 3 horas, las células se lavaron con PBS y se recogieron mediante raspado de las células y se pipetearon en un tubo de centrifuga de 2,0 ml. Las células se centrifugaron a 12.000 RPM y el sobrenadante se descartó. El ARN celular total se aisló utilizando un kit de Aislamiento de ARN Total Atlas (n.º de Cat. K1036-1, BD Biosciences, anteriormente Clontech) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los sedimentos de ARN se disolvieron en H₂O sin ARNasa y se cuantificó mediante DO₂₆₀. Se realizó la RT-PCR utilizando un Kit Ambion Retroscrip (n.º de Cat. 1710, Ambion, Austin, TX) de acuerdo con las instrucciones del fabricante utilizando 2 µg de molde de ARN. Se utilizaron para la RT-PCR cebadores específicos para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa humana (GAPDH), la proteína 43 asociada al crecimiento (GAP-43), netrina-1, molécula de adhesión de células

neurales (NCAM-1), neurotrofina-3 (NT-3), neurotrofina-6 (NT-6), factor neurotrófico obtenido de la glía (GDNF) y factor-9 de crecimiento de fibroblastos (FGF-9). La GAPDH se utilizó como un control debido a que su transcripción no debería estar afectada por el tipo de estimulación utilizada en este ensayo. Los cebadores utilizados fueron los siguientes:

GAPDH 5' CCTGCACCACCAACTGCTTAG
5' AGACCACCTGGTGCTCAGTGT

GAP-43 5' AAAGTGCCCGGCAGGACGAGGGTAAAGA
5' GAAAGTGGACTCCACAGGGCCACACG

NT-3 5' AAGGAGTTTGCCAGAAGACTCGCTCAATTCC
5' CACGTAATCCTCCATGAGATAACAAGGGCGG

NT-6 5' CCCGGACCGCTGTGGACTTGGTTG
5' GTATAAGTCTCAGGCCCGGCCAGTC

Netrina-1 5' GCAGTCTGCCACTTGAAGGA
5' GCCATATTGCGTAGGCGAGGT

NCAM 5' CACAGCCATCCCAGCAACCTTGGG
5' GGGCAAACCTTATGAAGTGCCACAAA

GDNF 5' AAATGTCACTGACTTGGGTCTGGG
5' GACAGGTCATCATCAAAGGCGATGGG

FGF-9 5' CGCCTAATATCTCCTGGGTTGACACC
5' AATGCCAAATCGGCTGTGGTCTTTCC

5 Para la PCR, se añadieron 5 µl de producto de la reacción de RT a 45 µl del coctel de reacción de PCR (5 µl de tampón de PCR 10X, Tris-HCl 100 mM, pH 8,3, KCl 500 mM, MgCl₂ 15 mM, 2,5 µl de mezcla de DNTP 2,5 mM, 32,1 µl de H₂O (sin nucleasas), 2,5 µl de cada una de las soluciones madre de los cebadores sentido y antisentido 10 µM y 0,4 µl de Taq Polimerasa 5 U/µl (n.º de Cat. 2052, Ambion). Los parámetros de la PCR fueron: 94 °C durante 2 min (desnaturalización inicial), seguido de 30 ciclos de 94 °C durante 30 seg, 55 °C durante 30 seg y 72 °C durante 40 seg, con una etapa de limpieza final de 72 °C durante 5 min. Los productos de la PCR se resolvieron utilizando 10 µl de producto de PCR por pocillo, en geles de agarosa al 2,5 % procesados durante 2 horas a 58 V y teñidos con bromuro de etidio a 0,5 µg/ml. Se analizó la regulación positiva en veces en las imágenes digitales de los geles utilizando el programa informático de análisis de imágenes Scion (Scion, Frederick, MD). La intensidad de banda del carril que contenía producto de RT-PCT del ARN producido a partir del medio de adición solo se utilizó para normalizar las señales de los otros tratamientos (datos no mostrados).

Los análisis por RT-PCR mostraron que los genes de FGF-9, Netrina-1, NT-3, NCAM-1 y GAP-43 se activan en respuesta a la incubación con la matriz de regeneración. La activación génica por parte de la matriz de regeneración parece ser selectiva dado que la transcripción de los genes de GAPDH, NT-6 y GDNF no se estimuló en estos experimentos. Estos datos indican que la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y responde de forma selectiva a la matriz de regeneración con la activación de genes relacionados con la función y la diferenciación. El medio de producción complementado con factores de crecimiento solo proporcionó un aumento marginal de la actividad de la regulación positiva génica en comparación con el medio solo para FGF-9 y Netrina-1 únicamente. Estos resultados sugieren que la actividad de regulación positiva génica de la matriz de regeneración se debe a sus propiedades inherentes y no solo a la presencia de factores de crecimiento.

La activación de la expresión génica de NT-3, NCAM-1, Netrina-1, GAP-43 y FGF-9 por parte de la matriz de regeneración en las células SH-SY5Y puede inactivarse tratando la matriz a 60 °C durante 30 minutos (Figura 19). Para finalizar, el tratamiento de la matriz de regeneración con formalina o con irradiación gamma de alta energía (30 kGy, 30 min) también inactiva la matriz de regeneración (datos no mostrados).

Para el análisis de rutina, se determinó el efecto de la matriz de regeneración sobre la regulación positiva de la GAPDH (control), GAP-43, NCAM-1 y NT-3 para cuatro lotes de producción consecutivos. Se tomaron muestras de una matriz de regeneración de cada lote en el día 15 y 21 y se compararon con la actividad de inducción génica del material de partida (Tabla 8). Mediante RT-PCR se determinó la regulación positiva en veces de 4 ejecuciones de producción (2 casetes Opticell® por punto de tiempo). Los resultados se presentan como la media ± la desviación típica.

Tabla 8. Regulación positiva en veces promedio de GAPDH, NT-3, NCAM-1 y GAP-43 en células de neuroblastoma SH-SY5Y después de la incubación con la matriz de regeneración en los días 0 (material de partida), 15 y 21 de producción.

Tiempo (días)	GAPDH	NT-3	NCAM-1	GAP-43
0	1,1 ± 0,1	2,5 ± 0,2	2,9 ± 0,3	3,0 ± 0,3
15	0,9 ± 0,1	3,9 ± 1,1	4,4 ± 1,7	4,7 ± 1,8
21	1,0 ± 0,2	4,5 ± 1,9	4,7 ± 2,2	5,6 ± 3,0

5 **Ejemplo 6.1. Efecto de la matriz de regeneración producida sin complementos de factores de crecimiento sobre la inducción génica en células de neuroblastoma humano.**

Se produjo una matriz de regeneración utilizando medio DMEM:F12 solo sin ninguna complementación con factor de crecimiento. La respuesta de regulación positiva de genes en células de neuroblastoma SH-SY5Y para GAPDH, NT-3, NCAM-1 y GAP-43 se comparó con una matriz de regeneración producida con complementación con ITS (2X), EGF (20 ng/ml) y bFGF (40 ng/ml). La matriz de regeneración producida sin factores de crecimiento contiene una actividad de regulación positiva de genes que no se modifica de forma apreciable cuando se produce en medio de producción con complementos de factores de crecimiento (datos no mostrados).

15 **Ejemplo 6.2. Actividad de la regulación positiva de genes neuronales de la matriz de regeneración.**

La matriz de regeneración formada durante 12 días tiene actividad de regulación positiva de genes neuronales, mientras que su solución circundante (SC), así como la solución inicial (día 0) que formaría la matriz de regeneración (Rep), tienen una actividad limitada de regulación positiva de genes neuronales. Las Figuras 18A-18C muestran resultados de RT-PCR sobre células de neuroblastoma humano SHSY tratadas con matriz de regeneración durante 3 horas. Valores presentados como regulación positiva en veces por encima del control convencional. Las matrices de regeneración se produjeron en paralelo a partir de sangre completa no coagulada (tratada con EDTA) procedente del mismo donante humano. A = medio base DMEM/F12 con complementos (un medio de producción de matriz de regeneración convencional). ITS = complemento de insulina + transferrina + selenio añadido a los medios base DMEM/F12. EGF = complemento de factor de crecimiento epidérmico añadido a los medios base DMEM/F12. FGF = complemento de factor 2 de crecimiento de fibroblastos añadido a los medios base DMEM/F12. Todos = complementos de ITS + EGF + FGF añadidos a los medios base DMEM/F12. Ninguno = sin complementos añadidos a los medios base DMEM/F12. Sin alimento = no se añadieron medios adicionales después del inicio del período de formación de la matriz de regeneración (día 0).

Las columnas A-S en las Figuras 18A-18C se refieren a las siguientes matrices de regeneración:

- A = Medio de producción de matriz de regeneración completo;
- B = Día-12, Todos, RM-1;
- C = Día-12, Todos, SC-1;
- D = Día-12, ITS, RM-1;
- E = Día-12, ITS, SC-1;
- F = Día-12, EGF-ITS, RM-1;
- G = Día-12, EGF-ITS, SC-1;
- H = Día-12, FGF-ITS, RM-1;
- I = Día-12, FGF-ITS, SC-1;
- J = Día-12, Ninguno, RM-1;
- K = Día-12, Ninguno, SC-1;
- L = Día-12, Sin Alimento, RM-1;
- M = Día-12, Sin Alimento, SC-1;
- N = Día-0, EGF-ITS, Rep-1;
- O = Día-0, EGF-ITS, Rep-2;
- P = Día-0, FGF-ITS, Rep-1;
- Q = Día-0, FGF-ITS, Rep-2;
- R = Día-0, Ninguno, Rep-1;
- S = Día-0, Ninguno, Rep-2.

Como puede observarse en las Figuras 18A-18C, en todos los casos, la matriz de regeneración el día 21 presentó una actividad de regulación positiva de genes neuronales aumentada en comparación con su solución inicial (día 0). La solución circundante en el día 21 continúa presentando la misma actividad limitada que se observó en la solución inicial (día 0). Por lo tanto, solo la matriz de regeneración formada presentó actividad aumentada, y su formación no dio como resultado una actividad disminuida de su solución circundante. Por tanto, la actividad de regulación positiva de genes neuronales total de los cultivos aumentó de forma espectacular a lo largo del tiempo a medida que se

formaban las matrices de regeneración.

Ejemplo 7. Efecto de la matriz de regeneración sobre células Neuroscreen-1® de rata (inducción de extensiones de neuritas).

5 Las células Neuroscreen®, un subclón potenciado procedente de células de feocromocitoma PC-12 de rata (Tsuji, M. y col., Induction of neurite outgrowth in PC12 cells by alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron through activation of protein kinase C and the Ras-extracellular signal-regulated kinase pathway, J. Biol. Chem. 276, 32779-32785, 2001; Wu, Y. Y. y Bradshaw, R. A., Synergistic induction of neurite outgrowth by nerve growth factor or epidermal growth factor and interleukin-6 in PC12 cells, J Biol Chem 271,13033-13039, 1996), se obtuvieron de Cellomics (n.º de Cat. R04-0001-C1) y se incubaron con una matriz de regeneración. Las células Neuroscreen® respondieron mediante la
10 extensión de neuritas. Además, la morfología de las células Neuroscreen® cambió y se aplanó y se hicieron más alargadas en presencia de la matriz de regeneración (Figura 20).

Para los estudios de interacción de células Neuroscreen®-matriz de regeneración, las células y el material de muestra de la matriz de regeneración se prepararon utilizando el siguiente procedimiento. Las células Neuroscreen® se mantuvieron antes del ensayo de interacción mediante cultivo de rutina en plástico recubierto de colágeno y se
15 subcultivaron en la confluencia utilizando medio basal que consistía en RPMI (n.º de Cat. 10-040-CV, Mediatech), Glutamina 4,0 mM (n.º de CAT. 25-005-CI, Mediatech) complementado con suero de caballo al 20 % (n.º de Cat. 35-030-CV, Mediatech) y suero fetal bovino al 10 % (n.º de Cat. 35-010, Mediatech). El día anterior se establecieron las interacciones de la matriz de regeneración, se tripsinizaron las células, se recontaron y cultivaron a 2.000 células por pocillo en placas de cultivo celular de 96 pocillos (BD Biosciences, n.º de Cat. 47743-953, Axygen). Los casetes de
20 Opticell® que contenían la matriz de regeneración se abrieron y la matriz de regeneración se transfirió a un colador de células de nailon de 100 µm (n.º de Cat. 352360, BD Falcon), se tamizaron y se dispersaron en 1 ml de PBS (n.º de Cat. MT21-030-CM, Mediatech). Se añadieron 10 µl de suspensión de matriz de regeneración dispersa a cada pocillo que contenía células Neuroscreen® sembradas el día anterior.

Para cada lote de producción, se tomaron muestras para los análisis anteriores a los 0, 15 y 21 días después del inicio. Se ensayó la formación de extensión de procesos de neuritas en las células Neuroscreen® utilizando
25 inmunotinción para β-tubulina como se indica a continuación. Las células se fijaron después de 4 días en cultivo añadiendo el 10 % v/v de formaldehído al 37 % (n.º de Cat. 2106-01, J. T. Baker) de forma directa al medio de cultivo en el pocillo. Las placas se incubaron a 37 °C durante 30 min, se lavaron 2X con PBS, se permeabilizaron y se bloquearon con tampón de bloqueo (suero de cabra normal al 10 % n.º de Cat. S26-100M, Chemicon, BSA al 5 %
30 n.º de Cat. 2910, Omnipure, Saponina al 0,1 % n.º de Cat. 102855, MP-Biochemicals) durante 2,5 horas y se tiñeron durante 16 horas a 4 °C utilizando anticuerpo anti β-tubulina (monoclonal de ratón, sobrenadante de cultivo celular, n.º de Cat. E7, Developmental Studies Hybridoma Bank) diluido 1:100 en tampón de bloqueo. Las células se lavaron 2X en PBS y se marcaron con anticuerpo secundario anti ratón de Cabra alexa 488 (n.º de Cat. A11029, Invitrogen) diluido 1:200 en tampón de bloqueo. Las células se contratiñeron con Hoechst 33342 (n.º de cat. H1399, Invitrogen)
35 a 2 µg/ml en PBS durante 30 minutos y después se lavaron 1X con PBS. Las placas se exploraron con un microscopio KineticScan (Cellomics, V2.2.0.0 Build 19) utilizando la Bio-aplicación V2.0 para la extensión de neuritas.

Los parámetros de rendimiento seleccionados incluyen, células totales, índice de extensión de neuritas (IEN), que es el porcentaje de células en un pocillo con una longitud de neurita total por encima de 10 µm, y la longitud de neurita
40 promedio por célula (LNP) en µm.

El control positivo para este ensayo fue la adición de factor de crecimiento nervioso (FCN, n.º de Cat. 13257-019, Invitrogen) a 100 ng/ml. En resumen, los tratamientos utilizados fueron como sigue, cada uno con y sin FCN: matriz de regeneración, Medio Basal de Neuroscreen, Medio Basal de Neuroscreen + FCN 100 ng/ml, matriz de regeneración preparada sin factores de crecimiento.

45 Solo se analizaron los pocillos con recuentos celulares por encima de 100 células por campo. El IEN promedio por pocillo se dividió por el valor de IEN promedio de los pocillos de control positivo que contenían medio basal Neuroscreen® más FCN 100 ng/ml. Este valor se presenta como el porcentaje de respuesta de FCN. Los datos procedentes de 4 experimentos independientes que prueban la estimulación de la extensión de neuritas de células Neuroscreen® se muestran en la Figura 21. La estimulación de la extensión de neuritas por parte de la matriz de
50 regeneración sin complementos de factores de crecimiento en comparación con la observada con ellos se muestra en la Figura 22.

Estos resultados indican que la matriz de regeneración tiene una actividad de inducción de neuritas significativa cuando se prueba en células Neuroscreen®. Sin embargo, a diferencia de los resultados procedentes de los estudios de regulación positiva de genes con células de neuroblastoma, la actividad de extensión de neuritas de la matriz de regeneración puede aumentarse de forma significativa mediante la adición de los complementos de ITS, EGF y bFGF durante la producción de la matriz de regeneración.
55

Ejemplo 8. Protección y potenciación de la actividad de los factores de crecimiento mediante la matriz de regeneración.

Se envió sangre periférica humana recogida en diez tubos Vacutainer™ de 8 ml que contenían K2EDTA, durante una noche en hielo y después se pusieron de forma vertical en un congelador a +4 °C durante 6 horas para permitir que la sangre se separara por gravedad. Los tubos Vacutainer™ que contenían la sangre separada por gravedad se colocaron de forma cuidadosa en vertical en un congelador a -20 °C para el almacenamiento. Dos días más tarde, cuatro de los tubos se retiraron del congelador, se pusieron de forma vertical en una gradilla y se dejaron descongelar a 20 °C. Una vez descongelados, la fracción plasmática-plaquetaria-leucocitaria de dos de los tubos se retiró y se puso en un tubo cónico de 50 ml, y los contenidos totales de los dos tubos restantes se pusieron en otro tubo cónico de 50 ml. Después de mezclar de forma exhaustiva el contenido de cada tubo cónico, 5 ml de cada tubo cónico se pusieron en tubos cónicos de 50 ml distintos junto con 10 ml de medio TR-10 que contenían factor de crecimiento nervioso (FCN) 100 ng/ml. La composición del medio TR-10 se muestra en la Tabla 9. Después de mezclar de forma exhaustiva el contenido de cada tubo cónico, las soluciones se filtraron a través de un filtro de jeringa de 5 µm, seguido de un filtro de jeringa de 1,2 µm, y después se pusieron en tubos cónicos de 50 ml nuevos. Se añadió cantidad suficiente de medio TR-10 que contenía FCN 100 ng/ml para hacer que el contenido de cada tubo cónico fuese igual a 50 ml. Después de mezclar de forma exhaustiva el contenido de cada tubo cónico, se inyectaron cantidades de 10 ml de las soluciones en conjuntos separados de 5 Opticells™, y después se pusieron de forma horizontal en un incubador a 37 °C, CO₂ al 20 %, O₂ al 2 %, no humidificado. Por lo tanto, cada Opticell™ recibió 1 µg de FCN. Las muestras se dejaron sin tocar durante 6 días, después de lo cual se añadieron 3 ml de medio TR-10 a cada Opticell™. Se añadió 1 ml adicional de medio TR-10 a cada Opticell™ en los días 8, 10 y 12. El día 13, el contenido de cada Opticell™ se puso en tubos cónicos de 15 ml distintos y se centrifugó a 500 x g. Se retiró el sobrenadante y se almacenó para el análisis posterior. El contenido de cada tubo cónico de 15 ml después se lavó con PBS, se centrifugó a 500 x g y el sobrenadante se retiró y desechó. Esto se repitió dos veces más para retirar toda la solución original de la que estaba rodeada cada una de las Matrices de Regeneración (cuando estaban en los Opticells™). Cada Matriz de Regeneración (~ 1 g en masa y ~1 ml de volumen) se almacenó después para un análisis posterior. Cada Matriz de Regeneración contenía aproximadamente 5 mg de proteína. El nivel de hidratación de las matrices de regeneración podría ser casi de la mitad cuando se centrifugaron a 5.000 x g durante 30 min (y el sobrenadante líquido resultante se retiró).

Tabla 9. Composición de TR-10.

SALES INORGÁNICAS	mg/l		AMINOÁCIDOS	mg/l
Cloruro de calcio anhidro	255,49		L-Alanina	4,455
Nitrato férrico 9H ₂ O	0,404		Glicina	15,014
Cloruro de magnesio 6H ₂ O	142,31		L-Arginina HCl	147,251
Sulfato de magnesio anhidro	97,67		L-Asparagina H ₂ O	1,501
Cloruro de potasio	400		GlutaMAX™ I	217,23
Cloruro de potasio	1491		L-Histidina HCl H ₂ O	31,445
Bicarbonato de sódico	1280,1		L-Isoleucina	54,567
Cloruro de sodio	6800		L-Leucina	59,158
Fosfato de sodio dibásico 7H ₂ O	134,035		L-Lisina HCl	91,142
Fosfato de sodio monobásico	140		L-Metionina	17,308
Fosfato de sodio monobásico H ₂ O	62,509		L-Fenilalanina	35,516
Sulfato de cinc 7H ₂ O	0,14378		L-Prolina	5,757
			L-Serina	26,273
OTROS COMPONENTES	mg/l		L-Treonina	53,485
D-Galactosa	360,32		L-Triptófano	9,027
D-Glucosa (Dextrosa)	4154,602		L-Valina	52,952
Acetato de tocoferol DL	4,7273		L-Tirosina sal disódica	55,895
Ácido DL-lipoico tióctico	2,0632		L-Cisteína HCl H ₂ O	0,87815

(continuación)

OTROS COMPONENTES	mg/l		AMINOÁCIDOS	mg/l
Etanolamina HCl	4		L-Cistina 2HCl	1,567
Glutación (reducido)	153,665			
Holo transferrina humana	11		VITAMINAS	mg/l
Insulina recombinante completa (Recombulina)	20		Biotina	0,24431
Ácido linoleico	5,6088		Piridoxina HCl	0,030846
Ácido linolénico	2,7842		Ácido fólico	2207
MOPS	2092,7		Riboflavina	18,819
Putrescina 2HCl	32,216		Vitamina B ₁₂	67,769
Hipoxantina de sodio	2,37165		L-Carnitina	3,96
Piruvato de sodio	55,02		Cloruro de colina	139,62
Selenito de sodio	0,0134		i-Inositol	12,611
Timidina	0,365767		Niacinamida	6,107
			D-Pantotenato de calcio	23,827
			Piridoxal HCl	10,181
			Tiamina HCl	16,864
			Ácido ascórbico 2 Fos. mg	28,954

5 Dos semanas después, se prepararon los ensayos de Neuroscreen® como se describe en el Ejemplo 9. Se crearon las curvas de respuesta al factor de crecimiento nervioso (FCN) (véase la Figura 23). Dado que cada pocillo en la placa de 96 pocillos del ensayo de Neuroscreen® recibe 200 µl de solución, los pocillos con una concentración de FCN de 100 ng/ml recibieron un total de 20 ng de FCN.

Dado que estudios anteriores habían mostrado que la adición de 10 mg de matriz de regeneración duplicaba la longitud promedio de las neuritas (de neuritas por encima de 10 µm de longitud) de las células Neuroscreen® expuestas a FCN 100 ng/ml (véase la Tabla 10), se realizó un experimento para determinar el efecto de la adición de FCN a la solución de la matriz inicial en este ensayo.

10 *Tabla 10. Longitud de neurita promedio de células Neuroscreen™ expuestas a RMx y FCN 100 ng/ml. Los valores se expresan como el porcentaje del control positivo (FCN 100 ng/ml).*

Lote	Días	RM_x	Des. Tip.
51	6	170 %	46 %
	12	159 %	21 %
	15	ND	NA
	18	ND	NA
	21	176 %	NA
52	6	147 %	23 %
	12	184 %	26 %
	15	299 %	NA
	18	ND	NA
	21	244 %	64 %
53	6	266 %	5 %
	15	242 %	31 %
	18	169 %	28 %
	21	186 %	20 %

(continuación)

Lote	Días	RM _x	Des. Tip.
54	6	148 %	NA
	12	211 %	36 %
	15	212 %	44 %
	18	223 %	26 %
	21	263 %	25 %
55	12	245 %	87 %
	15	222 %	30 %
56	6	163 %	25 %
	12	267 %	72 %
	15	ND	NA
	21	225 %	49 %
57	12	192 %	33 %
	21	221 %	36 %
58	12	192 %	65 %
	15	214 %	28 %
	21	184 %	39 %
Promedio		209 %	40 %

ND. No determinado. NA. No aplicable (ya sea por ND o un solo punto de datos)

Se utilizaron tres de las cinco matrices de regeneración y sus soluciones correspondientes (sobrenadantes almacenados) de cada grupo para determinar las curvas de respuesta (véase a continuación) en el ensayo Neuroscreen®. Se obtuvieron resultados muy similares de la duplicación del promedio de la longitud de las neuritas (de neuritas de más de 10 µm de longitud) de células Neuroscreen® cuando las células Neuroscreen® se expusieron a la matriz de regeneración que contenía FCN (véase a continuación). Sin embargo, este efecto de duplicación se obtuvo solo con 0,2 mg de la matriz de regeneración obtenida a partir de sangre completa, y 0,03 mg de la matriz de regeneración obtenida a partir de la fracción plasmática-plaquetaria-leucocitaria (sin la fracción de eritrocitos, véase la Figura 24). Si el FCN añadido a la solución de matriz inicial se dispersaba de forma igual entre la matriz de regeneración en formación y la solución circundante, la cantidad total de matriz de regeneración añadida a los pocillos del ensayo de Neuroscreen® contenía solo 0,02 ng y 0,003 ng de FCN para las matrices de regeneración obtenidas a partir de sangre completa y la fracción plasmática-plaquetaria-leucocitaria, respectivamente. Si todo el FCN acababa en las matrices de regeneración, entonces la cantidad total de FCN por pocillo sería de 0,2 ng y de 0,03 ng, respectivamente. Sin embargo, las curvas de respuesta de FCN convencionales (que se realizaron en paralelo a estos experimentos con el mismo FCN y el mismo punto de tiempo (frescura del FCN) muestran que existe un efecto limitado, o no lo existe en absoluto, del FCN recién preparado sobre las células Neuroscreen® en cantidades menores que 10 ng por pocillo, y las máximas respuestas se producen a 100 ng de FCN por pocillo. Dado que la matriz de regeneración obtenida a partir de la fracción plasmática-plaquetaria-leucocitaria proporciona una duplicación de esta respuesta máxima a una cantidad de una tresmilésima a una treintamilésima (o menos) de la cantidad (o concentración) de FCN, la matriz de regeneración debe tener un efecto de sensibilización del factor de crecimiento (o similar) sobre las células Neuroscreen® junto con la estimulación de otras rutas de crecimiento de neuritas dado que la longitud de neurita promedio se duplicó por encima del valor umbral máximo que puede lograrse con FCN solo. Se ha determinado que la matriz de regeneración sola (sin ningún FCN) da como resultado una longitud de neuritas promedio de las células Neuroscreen® de aproximadamente el 60 % del control positivo (100 ng/ml de FCN).

Es interesante destacar que el sobrenadante (o solución que circunda la matriz de regeneración en cada Opticell® al final del período de formación de la matriz de regeneración de 13 días) también provocó una duplicación de la respuesta máxima de las células Neuroscreen® al FCN. Si el FCN añadido a la solución de matriz inicial se dispersó de forma equivalente entre la matriz de regeneración en formación y la solución circundante (sobrenadante), el efecto de duplicación (o respuesta máxima) se produce solo con 5 ng de FCN por pocillo, o una veintésima parte de la cantidad de FCN (o concentración) necesaria para la máxima respuesta convencional (que es solo la mitad de la respuesta obtenida con el sobrenadante). Por lo tanto, en el sobrenadante se observan efectos similares a los de la matriz de regeneración, aunque con una potencia más baja. Esto parece deberse a las propiedades que existen y se forman durante el procedimiento que también da como resultado la formación de la matriz de regeneración, así como partículas diminutas de la matriz de regeneración que no se habían agregado aún en los complejos de matriz de regeneración.

Además, dado que la actividad del FCN disminuye a lo largo del tiempo a 37 °C, la matriz de regeneración también parece tener efectos de protección de la actividad del factor de crecimiento. El ensayo de actividad de FCN sobre la matriz de regeneración de 13 días que se había almacenado a 4 °C durante dos semanas adicionales, muestra una actividad de FCN mucho más alta que el FCN recién preparado procedente del mismo lote. Se observaron estos mismos efectos con EGF, bFGF y BDNF en experimentos anteriores.

Ejemplo 9. Respuesta a la dosis en la matriz de regeneración preparada con medios base DMEM/F12 y medios base TR-10.

La Tabla 11 muestra una comparación de la respuesta a la dosis para la extensibilidad de neuritas (ensayos preparados como en el Ejemplo 7) de matrices de regeneración preparadas con medios base DMEM/f12 o con medios base TR-10. Los valores se expresan como el porcentaje del control positivo (FCN).

Tabla 11.

RM _x (mg)	DMEM/F12 Desv. Tip.	TR-10 Desv. Tip.
0	23 %	5 %
1	60 %	6 %
5	77 %	5 %
10	88 %	5 %

Ejemplo 10. Efecto de la matriz de regeneración sobre cultivos de células primarias procedentes de médula espinal fetal de rata.

Se obtuvieron médulas espinales de adultos y fetos de ratas sanas (E18). El protocolo del cultivo de células neuronales utilizado se adaptó a partir de Brewer y col. (Serum-free B27/neurobasal medium supports differentiated growth of neurons from the striatum substantia nigra, septum, cerebral cortex, cerebellum, and dentate gyrus, J. Neurosci. Res. 42, 674-683, 1995). Las médulas espinales se disecaron de forma rápida de los animales en 2 ml de Hibernate-A (Brainbits, Springfield, IL), complementado con B27 (n.º Cat. 17504-044, Invitrogen) y L-glutamina 0,5 mm (n.º Cat. 25-005-CI, Mediatech) a 4 °C en placas de petri de 35 mm. Se retiraron las meninges y el exceso de materia blanca en el mismo medio a una segunda placa a 4 °C. Las médulas espinales se transfirieron a un papel estéril prehumedecido con el mismo medio y se prepararon cortes de aproximadamente 0,5 mm de grosor perpendiculares al eje longitudinal de la médula espinal y se transfirieron a un tubo a 4 °C en el mismo medio. Después de agitar durante 8 minutos a 30 °C, los cortes se transfirieron, con una pipeta de calibre amplio, a otro tubo a 30 °C que contenía papaína. La papaína (15-23 unidades/mg de proteína, y no activada por cisteína) se preparó disolviendo 12 mg en 6 ml de Hibernate A, calentado durante 5 min a 37 °C. La solución se esterilizó por filtro y se almacenó a 4 °C. Los cortes se incubaron durante 30 min en un baño de agua a 30 °C, con una plataforma rotatoria a una velocidad suficiente para suspender los cortes (170 rpm). Los cortes se transfirieron a un tubo cónico de 15 ml que contenía 2 ml de Hibernate-A/B27 a 30 °C y se permitió que se asentara durante 5 min a TA. Los cortes se trituraron 10 veces (en aproximadamente 30 segundos) con una pipeta pasteur siliconizada (punta pulida por fuego). Se permitió que estos trozos se depositaran durante 2 min y el sobrenadante se transfirió a otro tubo. El sedimento procedente del primer tubo se resuspendió en 2 ml de Hibernate A/B27 y el procedimiento de trituración y deposición se repitió dos veces más. Los sobrenadantes procedentes de cada trituración se combinaron, proporcionando una suspensión de 6 ml.

Las células se sembraron en placa a 90-320/mm² en 60-150 µl de Neurobasal-A/B27, en vidrio autoclavado recubierto de forma previa con copolímero de lisina-arginina 50 µg/ml (LAS, BrainBits) y se distribuyeron en una placa de 100 mm. Una hora después de la siembra en placa y de la incubación (O₂ al 5,0 %, CO₂ al 5,0 %, resto de N₂) se levantó rápidamente el cubreobjetos, se dejó drenar y se transfirió a 0,4 ml de Neurobasal-A/B27 en una placa de 24 pocillos a 37 °C. El medio se aspiró, el cubreobjetos se aclaró una vez con Hibernate-A tibio y las células se realimentaron con Neurobasal-A/B27, glutamina 0,5 mM, gentamicina 10 µg/ml y bFGF 5 ng/ml. Las células se alimentaron el día 4 retirando la mitad del medio y reemplazándolo con un volumen equivalente de medio recién preparado que contenía 5 ng/ml de bFGF. Se permitió que las células neuronales se unieran y proliferaran durante 6 días después de que se utilizaran para los experimentos de interacción. Parecían sanas, proliferaron de forma continua y estaban a entre el 40-60 % de confluencia en el momento del inicio de las interacciones.

Se evaluaron tres lotes distintos de matriz en los días 16, 9 y 7, respectivamente. Los tres lotes se obtuvieron a partir de sangre no coagulada recogida utilizando EDTA como anticoagulante. Dos de los lotes contenían glucosa, glutamina y piruvato, mientras que el otro lote no. Las suspensiones de células únicas procedentes de médulas espinales de rata embrionaria (E18) completa se prepararon de acuerdo con el protocolo anterior. Se cultivaron monocapas de células sobre cubreobjetos de vidrio y se incubaron con matriz o con medio de control. En el día 7 después del inicio del cultivo de interacción, se procesaron los cubreobjetos para ICQ. Las células de médula espinal primarias de control sin matriz se utilizaron como un control positivo para la funcionalidad del sistema de cultivo.

En las Figuras 25 y 26 se muestran las micrografías que presentan los resultados del análisis de inmunocitoquímica. Los controles dieron una tinción positiva para las neuronas maduras y todos ellos dieron una tinción negativa para células gliales (Figura 25). En los cultivos de control, el número de células positivas para Tuj1 es del 4,2 %, las células positivas para GFAP es del 0,4 %. No se detectaron células que se tiñeran con Tuj 1 y que fueran positivas para GFAP.

Las células neuronales incubadas con matriz presentaron un porcentaje más bajo de axones prominentes y largos; sin embargo, el porcentaje de células positivas para Tuj1 dentro del cultivo aumentó hasta el 55 % con la matriz de regeneración (con la mayoría de la tinción confinada a los cuerpos celulares y a procesos cortos) frente al 4,2 % sin matriz de regeneración. El porcentaje de células positivas para GFAP dentro del cultivo aumentó al 92 % con la matriz de regeneración frente a solo el 0,4 % para los controles. En el cultivo tratado con la matriz de regeneración, aproximadamente el 50 % de las células eran positivas tanto para Tuj 1 como para GFAP, lo que indica que eran células neuroprogenitoras trifásicas, mientras que en el control no se observaron tales células.

Esta observación indica que la matriz de regeneración estimula la proliferación de neuronas nuevas jóvenes. El aumento de la presencia de astrocitos durante el mismo período de tiempo puede representar un fenómeno de neurogénesis tisular y/o de una respuesta de "lesión" inicial, una etapa necesaria para y que precede a una cascada de curación.

Como se ve en la Figura 26, las células tratadas con la matriz de regeneración contenían células que eran positivas tanto para Tuj1 como para GFAP, lo que indica que eran células neuroprogenitoras trifásicas, mientras que el cultivo de control no mostraba tales células

20 **Ejemplo 11. Efecto de la matriz de regeneración sobre fibroblastos humanos *in vitro*.**

Se mantuvieron fibroblastos de prepucio neonatal humano (Línea de células n.º CCD 1079 Sk, n.º Cat. CRL 2097, ATCC), antes del ensayo de interacción mediante cultivo de rutina y pase en la confluencia utilizando medio de fibroblastos basal (DMEM con SFB al 10 % y pen-estrep).

Las células se tripsinizaron y se sembraron en placa sobre membrana Opticell® vacía (Opticell®) o membrana Opticell® con matriz de regeneración unida formada utilizando sangre coagulada (Matriz de Regeneración). Las membranas se cortaron a 1 cm². Las membranas previamente se habían unido a la parte inferior de una placa de 6 pocillos utilizando un pequeño trozo de vaselina estéril. El punto de vaselina se puso en la parte inferior del pocillo antes de añadir medio y el medio se añadió de forma posterior y las membranas se pusieron al final presionando en el centro desde la parte superior. Cada pocillo contenía 2 Opticell® y 2 tratamientos de matriz de regeneración. Las células tripsinizadas procedentes de una placa confluyente, se recontaron y se sembraron en placa a una densidad de 20.000 células por pocillo en 3 ml de medio. Las placas se pusieron en una incubadora y, tras 2 horas, se fijaron algunas muestras representativas y se tiñeron sus núcleos y se estimaron las cantidades de células. El resto de las membranas no se alteraron durante 2 días adicionales. Se añadió BrdU (n.º Cat 203806, EMD Biosciences) hasta 20 µM en medio de cultivo diluyendo una solución madre de 10 mM. Después del período de incubación, las membranas se sumergieron en 1 ml de etanol al 70 % enfriado en hielo (n.º Cat. UN1170, EM Science) en glicina 15 mM (n.º Cat. G-8790, Sigma) en una placa de 24 pocillos. Las células fijadas se almacenaron a -20 °C durante al menos 24 h. Para la detección de BrdU, las células se lavaron una vez en PBS (n.º cat. MT21-030-CM, Mediatech), se trataron con una dilución 1:10 del anticuerpo monoclonal anti BrdU-reactivo de nucleasa para el Kit11 (n.º Cat. 1299964, Roche) y se incubaron durante 1 h a 37 °C. Las células se lavaron 2X en PBS y se incubaron con una dilución 1:200 de anticuerpo de cabra anti ratón conjugado con Alexa-488 (n.º Cat. A11029, Invitrogen) en tampón de bloqueo (suero de cabra normal al 10 % n.º Cat. S26-100M, Chemicon, BSA al 5 % n.º Cat. 2910, Omnipure, Saponina al 0,1 % n.º Cat. 102855, MP-Biochemical, solución final esterilizada por filtración a través de un filtro de 0,2 µm y almacenada a 4 °C) a temperatura ambiente durante 1 h. Las muestras se contratiñeron con Hoechst 33342 2 µg/ml (n.º cat. H1399, Invitrogen, solución madre de 10 mg/ml mantenida a -20 °C) en PBS durante 30 min y se lavaron una vez en PBS. Después, las membranas se invirtieron y se montaron en 50 µl de glicerol otra vez sobre una placa de 24 pocillos. La placa se almacenó a 4 °C hasta su exploración, al cabo de una semana.

El análisis de las imágenes se realizó con un KineticScan (Cellomics, V2.2.0.0 Build 19) utilizando un programa informático de Bioaplicación Target Activation V2.0. Las imágenes se almacenaron en el disco duro en el formato patentado Cellomics y se analizaron mientras la placa se exploraba. Los ajustes para el establecimiento del umbral de las células positivas se obtuvieron representando un histograma de las células negativas y positivas para cada sesión de tinción. Las placas en donde las células se habían despegado de todos los pocillos durante la fijación o en donde no se observó señal no se incluyeron en el análisis final.

Las células que crecían en la membrana Opticell® tenían un total del 21,8 ± 2,6 % de positivos para BrdU, mientras que solo el 13,4 ± 2,0 % fueron positivas cuando crecían en la matriz de regeneración. Las diferencias en la unión inicial se descartaron recontando las células justo antes de la unión (es decir, el número total de células unidas era idéntico entre las dos muestras).

Los fibroblastos se unen a la matriz de regeneración en 2 horas en las mismas cantidades que al Opticell® de control, pero el tamaño nuclear se reduce (lo cual posiblemente es indicativo de las primeras fases de la apoptosis) y la cantidad de células positivas para BrdU disminuye en los fibroblastos que crecen en la matriz de regeneración

durante un periodo de 24 horas (véanse las Figuras 28A-C). Los cultivos de fibroblastos cultivados durante períodos más largos sobre estas matrices de regeneración dieron como resultado una densidad notablemente más baja de fibroblastos (experimentando algunos de estos fibroblastos apoptosis) en comparación con los cultivos de control. La Figura 27 muestra esta diferencia en la densidad de crecimiento de los fibroblastos cultivados durante 5 días sobre matrices de regeneración preparadas a partir de sangre completa filtrada por 5 µm.

Ejemplo 12. Efecto de la matriz de regeneración sobre astrocitos humanos *in vitro*.

Para los astrocitos se utilizaron los mismos tratamientos y condiciones de cultivo que para los fibroblastos, excepto en que el ensayo de cambio morfológico se realizó utilizando tinción para la proteína ácida glial fibrilar (GFAP). Los astrocitos humanos primarios (n.º Cat. 1800, Sciencell, San Diego, CA) se cultivaron en medio basal (Astrocyte Medium, n.º Cat. 1801, ScienCell) sobre placas recubiertas de poli-D-lisina y se pasaron en confluencia. Un día antes de los experimentos de interacción, las células se tripsinizaron, se recontaron y se sembraron en placa a 2000 células por pocillo para BrdU en placas de 96 pocillos recubiertas de poli-D-lisina (n.º Cat. 354461, BD Falcon).

Para cada lote se tomaron muestras para los análisis anteriores, a los 0, 6, 12, 15, 18 y 21 días después del inicio. Cada tratamiento se replicó 4 veces para cada medida (por ejemplo 4 pocillos por muestra). Para la proliferación, tras 2 días en presencia de la matriz de regeneración se añadió BrdU (n.º Cat. 203806, EMD Biosciences) hasta 20 µM en medio de cultivo diluyendo 1:20 una solución madre de 400 µM en 200 µl de medio. Las células se incubaron a 37 °C, O₂ al 5,0 %, CO₂ al 5,0 %, resto de N₂ durante 1,5 h adicionales. El medio se retiró por decantación y las células se fijaron con etanol al 70 % enfriado en hielo (n.º Cat. UN1170, EM Science) en glicina 15 mM (n.º Cat. G-8790, Sigma). Las células fijadas se almacenaron a -20 °C durante al menos 24 h. Para la detección de BrdU, las células se lavaron una vez en 200 µl de PBS (n.º cat. MT21-030-CM, Mediatech), se trataron con una dilución 1:80 de anticuerpo monoclonal anti BrdU-reactivo de nucleasa para el Kit11 (n.º Cat. 1299964, Roche) y se incubó durante 1 h a 37 °C. Las células se lavaron 2X en PBS y se incubaron con una dilución 1:200 de anticuerpo de cabra anti ratón conjugado con Alexa-488 (n.º Cat. A11029, Invitrogen) en tampón de bloqueo (suero de cabra normal al 10 % n.º Cat. S26-100M, Chemicon, BSA al 5 % n.º Cat. 2910, Omnipure, Saponina al 0,1 % n.º Cat. 102855, MP-Biochemical, solución final esterilizada por filtración a través de 0,2 µm y almacenada a 4 °C) a temperatura ambiente durante 1 h. Las muestras se contratiñeron con Hoechst 33342 2 µg/ml de (n.º cat. H1399, Invitrogen, solución madre 10 mg/ml mantenida a -20 °C) en PBS durante 30 min y se lavaron una vez en PBS, y se almacenaron a 4 °C hasta que se exploraron, habitualmente al cabo de una semana. Tras la fijación con etanol y el almacenamiento, las células se trataron con HCl 2 N (n.º Cat. 2612-14, Mallinckrodt chemicals) durante 30 min y se neutralizaron con Tris 100 mM, HCl pH 8,5 (n.º Cat. 9230, OmniPure) y se lavaron 2X con PBS. Las células se incubaron en 50 µl de una dilución 1:200 de anticuerpo monoclonal frente a BrdU conjugado con Alexa-488 (n.º Cat. MD5420, Caltag laboratories) en tampón de bloqueo durante 16 h a 4 °C. Las células se lavaron dos veces en PBS y se incubaron con una dilución 1:200 de anticuerpo de cabra anti ratón conjugado con Alexa 546 (n.º Cat. A11030, Invitrogen) en tampón de bloqueo durante 3 h. Las células se contratiñeron en 200 µl de Hoechst 2 µg/ml en PBS durante 30 min y se almacenaron en PBS. El análisis de las imágenes se realizó con un KineticScan (Cellomics, V2.2.0.0 Build 19) utilizando un programa informático de Bio-application Target Activation V2.0. Las imágenes se almacenaron en el disco duro en el formato patentado de Cellomics y se analizaron mientras la placa se exploraba. Los parámetros para la determinación del umbral de las células positivas se obtuvieron representando un histograma de las células negativas y positivas para cada sesión de tinción. Las placas en donde las células se habían despegado de todos los pocillos durante la fijación o en donde no se observó señal no se incluyeron en el análisis final. En conjunto, los astrocitos cultivados en presencia de la matriz de regeneración tenían menos núcleos positivos para BrdU (13,9 ± 2,3 %) que los cultivados sin matriz de regeneración (18,5 ± 2,4 %), lo que proporciona una posible explicación para la observación de la cicatrización glial reducida en lesiones de médula espinal tratadas con la matriz de regeneración en comparación con los controles.

Ejemplo 13. Efecto de la matriz de regeneración sobre médula espinal de rata lesionada *in vivo*.

Para evaluar la actividad *in vivo* de la matriz de regeneración se utilizaron tres modelos de rata de modelos de lesión de médula espinal:

- Sección completa (defecto de 5 mm).
- Hemisección (defecto de 5 mm, lado derecho).
- Contusión (caída de peso de 50 mm).

Todos los estudios en animales se realizaron utilizando protocolos aprobados por los IACUC (siglas del inglés *Institutional animal care and use committees*: Comités institucionales de cuidado y uso de animales) con procedimientos de cuidado de animales quirúrgicos y posquirúrgicos normalizados. Se utilizaron en estos estudios ratas desnudas (Biomedical Research Models, Inc., Worcester, MA) para minimizar las reacciones inmunológicas contra la matriz de regeneración humana. Para acceder a la médula espinal se realizó una incisión en la línea media, por encima de la columna vertebral desde la T8 hasta la T11, y la piel y la fascia dorso-lumbar se retraieron. Ambos lados de la columna vertebral se expusieron mediante disección roma. Se realizó una laminectomía dorsal a nivel de T8-T9. Se cortó la duramadre y se retrajo, exponiendo la médula espinal. En los estudios de sección, se cortó un segmento de grosor completo de la médula espinal entre T8 y T9 de 5 mm de longitud y se retiró de forma cuidadosa. En el modelo de LME por hemisección, se expuso la médula espinal como se describe anteriormente y

5 se creó de forma quirúrgica un defecto de 5 mm en el lado derecho de la médula espinal. El implante de la matriz de regeneración se utilizó para rellenar los defectos. La dura, los ligamentos que están por encima, los músculos y la piel se cerraron mediante sutura. En el modelo contusión, la duramadre de la médula espinal expuesta se golpeó mediante una caída de peso de 50 mm utilizando el IMPACTADOR de NYU y se dejó que los animales se restablecieran durante 2 semanas después de la lesión. Después del período de 2 semanas de restablecimiento se implantó a los animales la matriz de regeneración de forma quirúrgica en la médula espinal, de forma adyacente al área de la lesión. Se dejó que todos los animales se restablecieran en sus propias jaulas y se administraron inyecciones subcutáneas de antibióticos durante tres días para prevenir infecciones. Se evaluaron de forma periódica las funciones sensitivas y motoras de todos los animales de acuerdo con la versión modificada de la escala 10 neurológica de BBB (Basso, D. M. y col., A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats, J. Neurotrauma 12, 1-21, 1995). Las puntuaciones de BBB se registraron aproximadamente cada 2 semanas utilizando los criterios enumerados en las Tablas 12 y 13.

Tabla 12. Escala de clasificación locomotora de Basso, Beattie y Bresnahan

Clasificación	Descripción de la locomoción
0	Ningún movimiento de las extremidades posteriores (EP) observable
1	Ligero movimiento de una o dos articulaciones (habitualmente cadera y/o rodilla).
2	Movimiento extenso de una articulación o movimiento extenso de una articulación y movimiento ligero de otra articulación.
3	Movimiento extenso de dos articulaciones.
4	Movimiento ligero de las tres articulaciones de las EP.
5	Movimiento ligero de dos articulaciones y movimiento extenso de la tercera.
6	Movimiento extenso de dos articulaciones y movimiento ligero de la tercera.
7	Movimiento extenso de las tres articulaciones de las EP.
8	Barrido sin soporte de peso o emplazamiento plantar de la pata sin soporte de peso.
9	Emplazamiento plantar de la pata con apoyo de peso solo en posición (es decir cuando está estacionario) o desplazamiento dorsal ocasional, frecuente o consistente sustentado con peso y sin desplazamiento plantar.
10	Pasos plantares con apoyo de peso ocasionales, sin coordinación ED-EP.
11	Pasos plantares con apoyo de peso frecuentes a consistentes y sin coordinación ED-EP.
12	Pasos plantares con apoyo de peso frecuentes a consistentes y coordinación ED-EP ocasional.
13	Pasos plantares con apoyo de peso frecuentes a consistentes y coordinación ED-EP frecuente.
14	Pasos plantares con apoyo de peso consistentes, coordinación ED-EP consistente y la posición predominante de la pata durante la locomoción está rotada (de forma interna o externa) cuando hace un contacto inicial con la superficie así como justo antes de que se levante al final de la postura o desplazamiento plantar frecuente, coordinación ED-EP consistente y desplazamiento dorsal ocasional.
15	Desplazamiento plantar consistente y coordinación ED-EP consistente; y sin espacio entre los dedos o espacio entre dedos ocasional durante el avance de la extremidad delantera, la posición de la pata predominante es paralela al cuerpo en el contacto inicial.
16	Desplazamiento plantar consistente y coordinación ED-EP consistente durante la marcha, y se produce espacio entre los dedos de forma frecuente durante el avance de la extremidad delantera. La posición predominante de la pata es paralela en el contacto inicial y girada al levantar.
17	Desplazamiento plantar consistente y coordinación ED-EP consistente durante la marcha; y se produce espacio entre los dedos de forma frecuente durante el avance de la extremidad delantera, la posición predominante de la pata es paralela al inicio del contacto y al levantar.
18	Desplazamiento plantar consistente y coordinación ED-EP consistente durante la marcha; y se produce espacio entre los dedos de forma consistente durante el avance de la extremidad delantera, posición predominante de la pata es paralela en el contacto inicial y girada al levantar.
19	Desplazamiento plantar consistente y coordinación ED-EP consistente durante la marcha; y se produce espacio entre los dedos de forma frecuente durante el avance de la extremidad delantera. La posición predominante de la pata es paralela en el contacto inicial y al levantar y la cola está abajo parte o durante todo el tiempo.
20	Desplazamiento plantar consistente y marcha coordinada consistente; espacio entre los dedos consistente, posición predominante de la pata es paralela en el contacto inicial y al levantar; e inestabilidad del tronco, cola consistentemente levantada.

(continuación)

Clasificación	Descripción de la locomoción
21	Desplazamiento plantar consistente y marcha coordinada, espacio entre los dedos consistente, posición predominante de la pata es paralela en toda la postura, estabilidad del tronco consistente y cola levantada de forma consistente.

Tabla 13. Definiciones de BBB

Locomoción	Definición
Ligero	Movimiento parcial de la articulación a través de menos de la mitad de la amplitud de movimiento de la articulación.
Extenso	Movimiento a través de más de la mitad de la amplitud de movimiento
Barrido	Movimiento rítmico de la EP en el que las tres articulaciones se extienden, después se flexionan completamente y se extienden otra vez: el animal habitualmente está de lado y la superficie plantar de la pata puede o no contactar el suelo. No es evidente el apoyo de peso a lo largo de la EP
Sin apoyo de peso	Sin contracción de los músculos extensores de la EP durante el emplazamiento plantar de la pata y sin elevación del cuarto trasero
Apoyo de peso	Contracción de los músculos extensores de la EP durante el emplazamiento plantar de la pata, o elevación del cuarto trasero - es decir, busca un cambio en el cuarto trasero y la posición del abdomen durante el desplazamiento.
Desplazamiento plantar	La pata está en contacto plantar con apoyo de peso, después la EP se avanza hacia adelante y se restablece el contacto plantar con apoyo de peso
Desplazamiento dorsal	El peso se apoya a lo largo de la superficie dorsal de la pata en algún punto en el ciclo de paso
Coordinación ED-ET	Por cada paso de ED se da un paso de EP, y las EP alternan. (Solo evalúa los períodos en que se dan > 3 pasos en una línea)
Ocasional	<50 %
Frecuente	51-94 %
Consistente	95-100 % solo si no hay episodios prolongados sin desplazamiento.
Inestabilidad del tronco	Cambios laterales de pesos que provocan contoneo de lado a lado o colapso parcial del tronco.

5 15a. Modelo de lesión de médula espinal de sección completa en la rata.

La Figura 29 muestra los resultados procedentes de los estudios de sección completa en ratas, en donde las lesiones por sección se rellenan con la matriz de regeneración o se dejan con el espacio vacío que se rellena mediante sangre como en los controles. En general, hubo un alto nivel de mortalidad asociada con este tipo de estudio debido a la gravedad de la lesión de la médula espinal y los resultados representan el estado neurofuncional en animales que sobrevivieron al menos 6 semanas. Las puntuaciones de BBB se controlaron a intervalos de 2 semanas durante hasta 12 a 14 semanas posimplante. Los siete animales con implantes de matriz de regeneración que sobrevivieron al menos 6 semanas poslesión/implante mostraron puntuaciones de BBB mejoradas (Figura 29). Los aumentos máximos se observaron a las 6-8 semanas posimplante. Los tres animales de control que sobrevivieron al menos 6 semanas no mostraron una mejora sustancial durante el período de evaluación de 12 semanas.

Además, las ratas que recibieron los implantes de matriz de regeneración tenían un número significativamente disminuido de lesiones (quistes) así como del volumen promedio de cada lesión por encima o por debajo del sitio de la lesión de la médula espinal (cirugía), en comparación con los animales de control (véase la Figura 30). Esto significa que la matriz de regeneración presentó efectos neuroprotectores en estos modelos animales, dando como resultado más conservación del tejido neuronal por encima y por debajo del sitio de la lesión.

20 15b. Modelo de lesión de médula espinal por hemisección en la rata.

La Figura 31 resume los resultados en donde se implantó la matriz de regeneración en la médula espinal dañada mediante hemisección. En el modelo de LME por hemisección la médula espinal se expuso como se describe anteriormente y se creó de forma quirúrgica un defecto de 5 mm en el lado derecho en la médula espinal. Este modelo no es tan severo como el modelo de sección y permite alguna función animal normal. Por ejemplo, el defecto inducido de forma quirúrgica permite el control de la vejiga pero no la función motora de la pata trasera derecha. El implante de la matriz de regeneración (n = 4) condujo a una supervivencia aumentada así como a un restablecimiento funcional (n = 3) en comparación con los controles no implantados (n = 2). Los animales de control no implantados murieron a la semana, antes del primer período de evaluación de BBB.

15c. Modelo de contusión de lesión de médula espinal en la rata.

En el modelo de contusión, se expuso la duramadre con la médula espinal subyacente y se indujo la LME mediante una caída de peso de 50 mm utilizando el IMPACTADOR MASCIS (anteriormente el IMPACTADOR NYU, W.M. Keck Center for Collaborative Neuroscience, Rutgers University, Piscataway, NJ). Se dejó que las ratas se restablecieran durante dos semanas y después se realizó una segunda cirugía, en donde se expuso la médula espinal y se colocó la matriz de regeneración adyacente al área de la lesión. La Figura 32 muestra que el implante de la matriz de regeneración también mejora las puntuaciones de BBB en las ratas con médula espinal dañada por contusión. En este estudio, 25 ratas tenían daño por contusión infligido en sus médula espinal y 19 animales sobrevivieron 2 semanas después de la contusión. De los animales supervivientes, 11 animales recibieron implantes de matriz de regeneración y 8 sirvieron como animales de control que recibieron ya sea implante biológicamente inactivado o no se sometieron a una segunda cirugía (y por lo tanto, sin implante). A las 6 semanas después de la lesión, estaban vivos 9 implantados con matriz de regeneración, 4 implantados con matriz inactivada y 3 controles no implantados. Las puntuaciones de BBB para estos animales supervivientes se evaluaron a intervalos de 2 semanas (Figura 32). Los animales implantados con matriz de regeneración se restablecieron como en los modelos de sección completa y de hemisección. Los animales implantados con matriz biológicamente inactivada se restablecieron de forma parcial, lo que indica que las propiedades estructurales de la matriz de regeneración sola tienen un potencial regenerativo significativo con respecto a los controles que no recibieron matriz. Para uno de los animales de control se observó un restablecimiento espontáneo sustancial aparente que parecía deberse a una lesión incompleta. Sin embargo, los efectos debilitantes menores pero medibles de la segunda cirugía se superaron mediante las matrices implantadas, lo que dio como resultado una mejora significativa de los animales.

Ejemplo 16. La matriz de regeneración humana es segura, bien tolerada y sustenta el restablecimiento funcional en cerdos con lesiones de médula espinal experimentales.

En los estudios piloto experimentales, cerdos macho que pesaban entre 20 y 45 kg recibieron distintos tipos de lesiones de médula espinal (impacto, penetración, desgarro/desgarramiento, hemisección quirúrgica) y se colocaron en los sitios de la lesión matriz de regeneración humana o tapones de fibrina porcina. Se probaron los distintos modelos para desarrollar una idea de los resultados de cada tipo de lesión sobre la funcionalidad locomotora sensitiva en cerdos, así como para obtener una idea de en qué modelo de lesión parecía trabajar mejor una matriz de regeneración. Hubo una clara tendencia de la matriz de regeneración humana, que inducía un restablecimiento funcional en cerdos con LME, con el efecto más significativo observado en lesiones por impacto graves que daban como resultado el desgarro y la pérdida de tejido de médula espinal. Estos experimentos también proporcionaron una oportunidad para evaluar la tolerabilidad y la posible seguridad del implante de matriz de regeneración. La médula espinal porcina es más del 98 % idéntica a la médula espinal humana en términos de su microentorno desde la T2 hasta la L2 y, por lo tanto, es un buen modelo para determinar cualquier posible cuestión sobre la seguridad que la matriz de regeneración pudiera tener en una médula espinal humana. No se observaron cuestiones sobre la seguridad detectables en ninguno de los cerdos que recibieron el implante de matriz de regeneración humana, incluyendo 3 cerdos que tenían una matriz de regeneración inyectada dos veces en sus médulas espinales en el curso de dos cirugías distintas separadas por 1-3 meses. No se descubrieron diferencias significativas entre los animales de control y los animales que recibieron el implante de matriz de regeneración en términos de sus pesos y comportamientos, incluyendo las observaciones generales hechas durante la cría de los animales sobre sus comportamientos de alimentación, bebida, interacciones sociales, micción y defecación, lo que indica que la matriz de regeneración es bien tolerada y relativamente no tóxica cuando se implanta en cerdos.

Las muestras de tejido tomadas un mes después del implante en algunos de los cerdos y sometidas a tinción para Tuj-1 indicaron que la matriz de regeneración implantada había inducido la formación de nuevas neuronas en el sitio de lesión de médula espinal. La Figura 37 muestra que las matrices de regeneración implantadas inducen la formación de nuevas neuronas positivas para Tuj-1 (mostrado con un aumento de 200x) al cabo de un mes del implante.

Estos estudios piloto preliminares sugirieron que la matriz de regeneración humana induce el restablecimiento locomotor en cerdos con LME. La Figura 33 muestra los resultados de estos estudios preliminares en los que se utilizó un sistema de puntuación ASIA (acrónimo del inglés *American spinal injury association*: Asociación norteamericana de lesión medular) modificado para evaluar el restablecimiento neurofuncional en estos animales. Alguno de los animales comenzaron con puntuaciones ASIA muy bajas debido a la gravedad del daño quirúrgico mientras que otros cerdos (incluyendo todos los animales de control) recibieron lesiones quirúrgicas menos graves y, por lo tanto, comenzaron con puntuaciones ASIA más altas.

Después de la finalización de estos estudios piloto, un estudio de seguridad de 7 semanas completo con ocultación doble demostró que una matriz de regeneración humana es segura y bien tolerada en cerdos que habían recibido lesiones de médula espinal experimentales. En estos estudios con ocultación doble los cerdos recibieron LME inducida de forma quirúrgica localizada en el lado derecho de sus médulas espinales, en las T8-T9 - una hemisección doble, separada por 5 mm, seguido de la extracción del trozo de médula espinal de 5 mm de longitud - y se les implantó ya sea matriz de regeneración humana o una cantidad equivalente de coágulo de sangre humana homogeneizado. El lado izquierdo de la médula espinal sirvió como un control de toxicidades no específicas relacionadas con la cirugía experimental y los implantes. En todos los animales se observaron de forma rutinaria

para cambios en el estado de salud global, el peso y las respuestas locomotoras durante 7 semanas después de la LME y el implante.

De forma inicial, se distribuyeron al azar dieciséis cerdos que coincidían en edad y en peso en 8 grupos de 2 animales cada uno, que se implantaron ya sea con matriz de regeneración humana o coágulos de sangre. Poco después de haber recibido la grave lesión de médula espinal cuatro animales murieron - dos en los grupos de tratamiento con la matriz de regeneración y dos en el de coágulo de sangre - lo que indica que la matriz de regeneración humana no se asociaba con una mortalidad aumentada en comparación con el grupo implantado con coágulo.

El implante de la matriz de regeneración pareció estar bien tolerado y, en general, ser seguro en cerdos en comparación con los animales implantados con coágulo y de control. La Figura 34 resume y compara las ganancias de peso semanales de los cerdos en los dos grupos. No hubo diferencias detectables en las ganancias de peso totales medias de los cerdos durante las 5 primeras semanas, con un aumento en la ganancia de peso de los cerdos implantados con matriz de regeneración con respecto a los cerdos de control durante las dos últimas semanas del período de estudio. Estos datos sugieren que la matriz de regeneración es bien tolerada en cerdos y que no es tóxica de forma sistémica. Además, los datos sugieren que durante las dos últimas semanas del período de estudio los cerdos implantados con matriz de regeneración comenzaron a ganar más masa muscular con respecto a los cerdos de control.

Las funciones locomotoras en todos los animales se midieron de forma inicial a las 72 h y después a intervalos de una semana después de la LME, utilizando un sistema de puntuación de capacidades sensitivas y motoras ASIA modificado para las patas traseras de los animales. La Figura 35 muestra las puntuaciones locomotoras de animales implantados con la matriz de regeneración o con el coágulo de sangre homogeneizado.

En estos estudios se midieron las puntuaciones de las capacidades sensitivas y motoras de partida 72 horas después de la LME quirúrgica y del implante, utilizadas como los valores iniciales, y después, los valores se determinaron a intervalos semanales durante 7 semanas. Los cerdos en ambos grupos de estudios comenzaron a restablecer las funciones locomotoras y sensitivas (del impacto en la médula espinal) al cabo de una semana de la LME quirúrgica y 2-4 semanas después del implante estos valores alcanzaron niveles constantes. Durante este período de tiempo de 2-4 semanas no se observaron diferencias significativas en las funciones locomotoras y sensitivas de los grupos implantados con la matriz de regeneración y con coágulo, lo que indica que la matriz de regeneración no impide el restablecimiento funcional en animales con LME ni provoca ningún deterioro adicional de la función de la médula espinal.

Aproximadamente 4-6 semanas después de la LME se observó en la mayoría de los animales un aumento adicional del restablecimiento sensorial y locomotor. Los niveles de restablecimiento observados en los animales implantados con matriz de regeneración a estos últimos puntos de tiempo eran más altos que los observados en los animales implantados con coágulo. Un análisis detallado de las diferencias en estos dos grupos en el punto de tiempo de 7 semanas indica que hubo una mejora significativa ($p = 0,03$) en las funciones del lado derecho (el lado que recibió la lesión) de los animales que recibieron la matriz de regeneración (Figura 36). La variabilidad mucho más alta dentro del grupo implantado con matriz de regeneración con respecto al grupo de control en este punto de tiempo de 7 semanas es indicativa de que la actividad biológica de la matriz de regeneración no ha alcanzado aún su valor de punto final (puntuación motora final). Se estimó que el punto final había estado aproximadamente a las 16 semanas.

Considerados en su conjunto estos estudios indican que la matriz de regeneración es segura y bien tolerada en cerdos, e induce el restablecimiento sensorial y locomotor tras la LME inducida de forma quirúrgica.

Ejemplo 17. Estudios de toxicología en ratas con BPL.

Para evaluar la posible toxicidad sistémica asociada con el implante de una matriz de regeneración se diseñó un estudio preclínico conforme a la norma ISO 10993-11 y BPL, y se realizó en el NAMSA (Northwood, OH). En este estudio se implantó una matriz de regeneración en el tejido subcutáneo de 14 ratas (7 machos y 7 hembras). El artículo de control (solución salina al 0,9 % estéril) se implantó de forma similar en un grupo de 14 ratas distinto (7 machos y 7 hembras). Se observó de forma diaria la mortalidad y los signos aparentes de toxicidad en los animales. Se realizaron de forma semanal exámenes detallados de los signos clínicos de enfermedad y de anomalía. Antes del implante se obtuvieron los pesos corporales de los animales y a intervalos semanales a lo largo de todo el estudio.

A las 4 semanas, los animales se sometieron a eutanasia y se recogieron muestras de ensayo de sangre para el análisis de hematología y de química clínica (todos los análisis se realizaron por parte del NAMSA). Se realizó una necropsia y se excindieron, pesaron y procesaron de forma histológica órganos seleccionados. El tejido subcutáneo alrededor de cada sitio de implante también se excindió de cada rata y se examinó de forma microscópica. Un patólogo cualificado realizó la evaluación microscópica de los sitios de implante así como de los órganos seleccionados. Se analizaron de forma estadística los pesos corporales, los pesos de los órganos, las proporciones de los pesos de los órganos/corporales, los valores de hematología y los valores de química clínica.

Después del implante subcutáneo en la rata los datos no revelaron evidencia de toxicidad sistémica del artículo de prueba (matriz de regeneración). Las observaciones clínicas diarias, los pesos corporales, los hallazgos de la

necropsia, los pesos de los órganos del animal y las proporciones de órganos/cuerpo estuvieron dentro de los límites aceptables y fueron similares entre y dentro de los grupos de tratamiento de prueba y de control. No hubo cambios en los valores de hematología o en los valores de química clínica en las ratas macho o hembra, que se consideraron como que eran biológicamente significativos o relacionados con el tratamiento con el artículo de prueba. La evaluación microscópica de los tejidos seleccionados no reveló evidencia de toxicidad sistémica en el grupo tratado con la matriz de regeneración. A base de los criterios histológicos, se consideró que la matriz de regeneración en las ratas macho y hembra era un irritante moderado cuando se comparó con el material de control de referencia de solución salina. Este último hallazgo está dentro del intervalo de la experiencia de la instalación de prueba para la evaluación de materiales bioabsorbibles y en el intervalo inferior para un implante xenogénico (en este caso la sangre completa humana obtenida de la matriz de regeneración se implantó en rata). En conclusión, la inyección local de una matriz de regeneración entre especies no conduce a ninguna toxicidad significativa y sugiere que una matriz de regeneración no provocará patología local cuando se implante en pacientes humanos de LME.

Ejemplo 18. Evaluación microscópica de cortes procedentes de un estudio de regeneración de médula espinal.

Se implantó una matriz de regeneración en una rata experimental en la que se había extirpado de forma quirúrgica 10 mm de médula espinal. Después de 10 días, la médula espinal se examinó de forma histológica. El defecto de la médula espinal central consistía microscópicamente de degeneración axonal walleriana central grave y de necrosis neurófila que se extendía aproximadamente 4,5 mm de forma radial desde el centro (un ancho total de 1 cm) debido a la extirpación quirúrgica de 1 cm de médula espinal. Rodeando al implante de matriz de regeneración había láminas de células gliales reactivas y de la microglía, algunas con hemosiderina, así como láminas de células de tipo mesenquimatoso/reticular primitivas manifiestas (véanse las Figuras 38A y 38B) que parecían expandirse (rellenar) el defecto de la médula espinal. Estas células parecen estar implicadas en el desarrollo de nuevo tejido neural y en la regeneración de la médula espinal. En la periferia del defecto había un engrosamiento de la leptomeninges con fibroplasia reactiva aumentada. La fibroplasia parecía expandirse a lo largo de la leptomeninges como un almacén de sustento para estas células de tipo mesenquimatoso/reticular primitivas manifiestas y parecía sustentar la regeneración de la médula espinal lesionada.

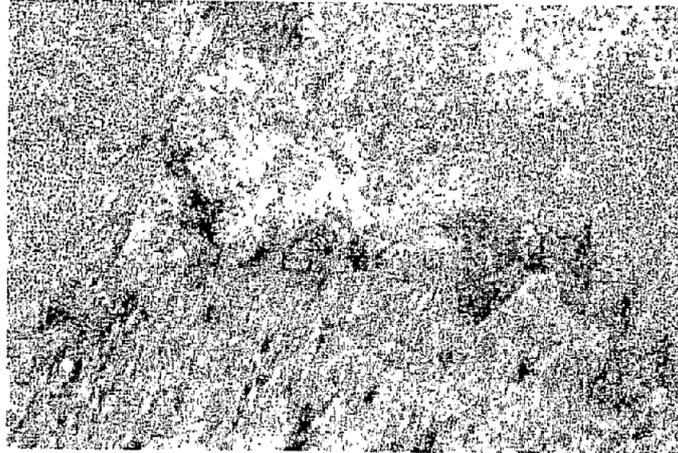
REIVINDICACIONES

1. Una matriz de regeneración bioabsorbible acelular obtenida de sangre y que se puede obtener mediante un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19, comprendiendo la matriz:
- 5 a) agregados de estructuras esféricas que son al menos de 100 nm de diámetro; y
b) un núcleo proteínico que tiene un contenido de proteína de al menos el 1 %;
- en la que la matriz carece de actividad metabólica sustancial en comparación con la inicialmente presente en dicha sangre;
- 10 y en la que adicionalmente la matriz tiene la capacidad de iniciar la regeneración tisular en un sujeto con daño tisular, aumentar la regeneración tisular en un sujeto con daño tisular, o ambas.
2. La matriz de regeneración bioabsorbible acelular de la reivindicación 1, que comprende fibras intercaladas entre los agregados.
3. La matriz de regeneración bioabsorbible acelular de la reivindicación 1 o 2, en la que dicha matriz se autoensambla.
- 15 4. La matriz de regeneración bioabsorbible acelular de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende adicionalmente una o más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en: transferrina, seroalbúmina, precursor de seroalbúmina, componente del complemento 3, hemoglobina de cadenas A-D, IgM, IgG1, inhibidor de la medulasa 2, anhidrasa carbónica, proteína CA1 y combinaciones de los mismos.
- 20 5. La matriz de regeneración bioabsorbible acelular de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que los anticuerpos CD56 reconocen las estructuras esféricas.
6. La matriz de regeneración bioabsorbible acelular de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende adicionalmente uno o más agentes terapéuticos.
7. La matriz de regeneración bioabsorbible acelular de la reivindicación 6, en la que dicho uno o más agentes terapéuticos se seleccionan del grupo que consiste en: proteínas, péptidos, fármacos, citocinas, moléculas de la matriz extracelular, factores de crecimiento y combinaciones de los mismos
- 25 8. La matriz de regeneración bioabsorbible acelular de la reivindicación 6 o 7, en la que dicho uno o más agentes terapéuticos se distribuyen de forma heterogénea dentro de la matriz de regeneración bioabsorbible acelular.
9. La matriz de regeneración bioabsorbible acelular de la reivindicación 6 o 7, en la que dicho uno o más agentes terapéuticos se distribuyen de forma homogénea dentro de la matriz de regeneración bioabsorbible acelular.
- 30 10. La matriz de regeneración bioabsorbible acelular de una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en la que dicha matriz de regeneración bioabsorbible acelular protege y/o potencia uno o más efectos beneficiosos de dicho uno o más agentes terapéuticos.
11. Una combinación de (i) la matriz de regeneración bioabsorbible acelular de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y (ii) células que se han sembrado o mezclado en la matriz después de que esta se ha producido o mientras se está produciendo.
- 35 12. La combinación de la reivindicación 11, en la que las células se seleccionan del grupo que consiste en: células madre, células progenitoras, células somáticas y combinaciones de las mismas.
13. La matriz de regeneración bioabsorbible acelular de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, o la combinación de cualquiera de las reivindicaciones 11 y 12, en la que dicha matriz de regeneración está en forma sólida o semisólida, en forma de una matriz tridimensional o en forma de una suspensión.
- 40 14. Un procedimiento de producción de una matriz de regeneración bioabsorbible acelular que comprende las etapas de
- a) proporcionar una muestra de sangre aislada;
- 45 b) eliminar células intactas de la muestra;
- c) añadir un medio de procedimiento en uno o más momentos seleccionados del grupo que consiste en: durante el aislamiento de la muestra, antes de la etapa de eliminación, antes de la etapa de incubación y durante la etapa de incubación, para proporcionar una fracción acelular líquida;
- d) incubar dicha fracción acelular líquida en una cámara de incubación sin agitar o perturbar de otra forma la muestra acelular durante 2 o más días, para formar una matriz de regeneración bioabsorbible acelular que
- 50 carece de actividad metabólica sustancial; y
- e) aislar la matriz de regeneración bioabsorbible acelular.

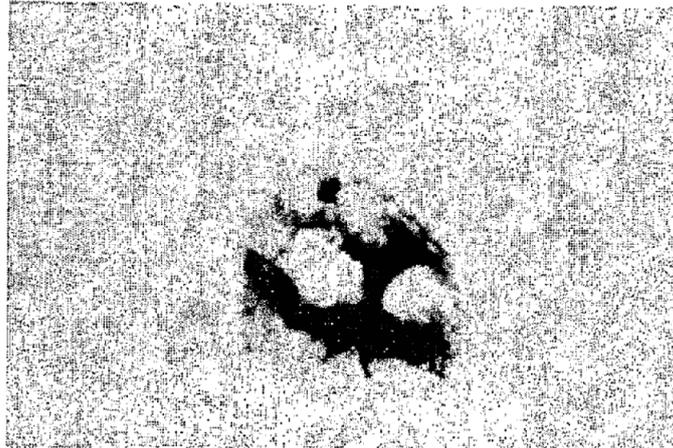
15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que dicha muestra comprende sangre o una fracción sanguínea, en el que la fracción sanguínea puede contener una capa leucocitaria, que puede adicionalmente ser una capa leucocitaria/plaquetaria/plasmática.
16. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que la muestra contiene un anticoagulante.
- 5 17. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que la muestra es sangre que contiene coágulos y el procedimiento comprende solubilizar los coágulos.
18. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 14-17, en el que dicha eliminación de células intactas en b) se efectúa mediante congelación, filtración (por ejemplo a través de un filtro de selección por tamaño) y/o centrifugación.
- 10 19. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que el filtro de selección por tamaño excluye partículas mayores de aproximadamente 5 μm , mayores de aproximadamente 1,2 μm y/o mayores de aproximadamente 0,8 μm .
20. Uso de la matriz de regeneración bioabsorbible acelular de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 o producida mediante el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 14-19, para la fabricación de un medicamento que se emplea para iniciar, aumentar, sustentar, estimular y/o dirigir la regeneración de tejido dañado, perdido y/o degenerado.
- 15 21. Uso de la matriz de regeneración bioabsorbible acelular de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 o producida mediante el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 14-19, para la fabricación de un medicamento para un procedimiento de terapia que comprende iniciar, aumentar, modular, estimular, sustentar y/o dirigir uno o más de los siguientes procesos: la cicatrización natural de heridas, el crecimiento tisular, la funcionalidad tisular, la estructuración, la conectividad, la angiogénesis, la proliferación y/o la activación de células progenitoras, el crecimiento y/o la proliferación celulares, la especialización y/o la elongación celulares, la desdiferenciación y/o diferenciación de células, la regulación positiva de genes celulares relacionados con la regeneración, y/o la inhibición de la formación de cicatrices.
- 20 22. Uso de la matriz de regeneración bioabsorbible acelular de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 o producida mediante el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 14-19, para la fabricación de un medicamento para estimular la actividad neurotrófica en o cerca de un sitio de tejido del sistema nervioso central dañado o degenerado, en la que dicha actividad neurotrófica se **caracteriza por** un aumento en la expresión de al menos un gen neurotrófico seleccionado del grupo que consiste en: FGF-9, Netrina-1, NT-3, NCAM-15 GAP-43 y Neuregulina.
- 25 23. Una composición farmacéutica para estimular, dirigir y/o sustentar la cicatrización de heridas y/o la regeneración tisular, el crecimiento tisular, el crecimiento celular, la regulación positiva de genes, la inhibición celular, la proliferación celular, la desdiferenciación celular, la diferenciación celular, la transdiferenciación celular, la extensión de neuritas, la regulación positiva de genes, uno o más procesos de cicatrización natural de heridas, o combinaciones de los mismos, y/o para estimular la actividad neurotrófica en o cerca de un sitio de tejido del sistema nervioso central dañado o degenerado, que comprende la matriz de regeneración bioabsorbible acelular de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 o producida mediante el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 14-19.
- 30
- 35

Figura 1. Transdiferenciación de macrófagos en células de tipo endotelial positivas para factor de Von Willebrand.

A. 200x



B. 400x



C. 400x

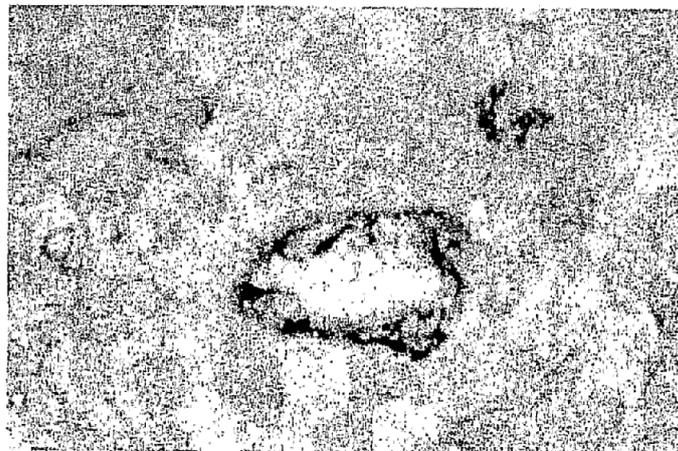
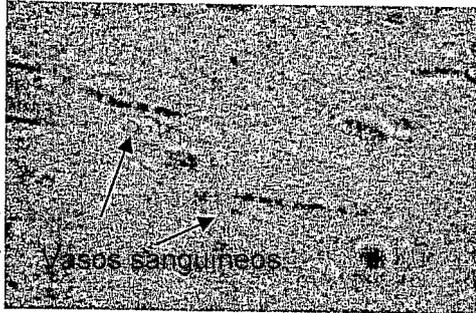
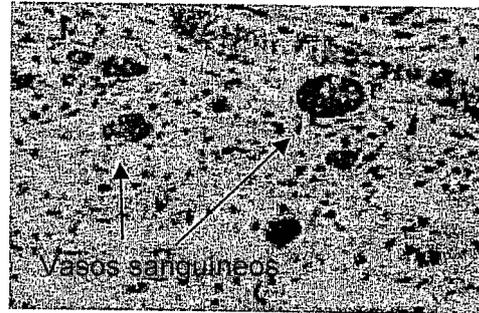


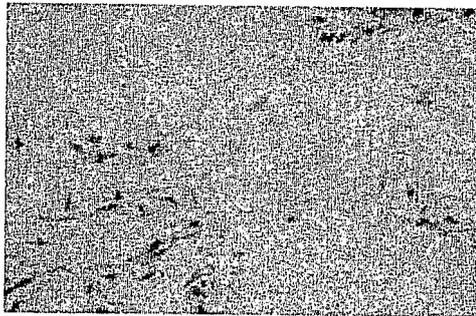
Figura 2. La matriz de regeneración sustenta la angiogénesis en tejido de médula espinal dañado en ratas



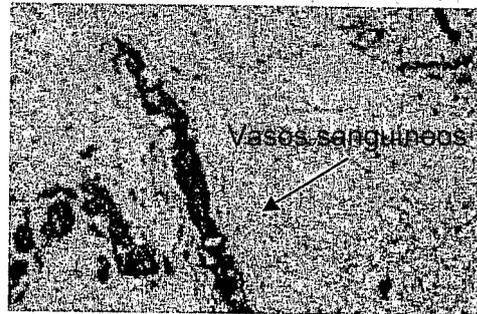
A. Médula espinal de rata sana



C. Sitio de la lesión con el implante de RMx.



B. Sitio de la lesión sin implante de RMx



D. Sitio de la lesión con el implante de RMx

Figura 3. Fotografía de la matriz de generación producida utilizando sangre no coagulada y filtración final por 1,2 μm contenida en el casete de producción Opticell®.

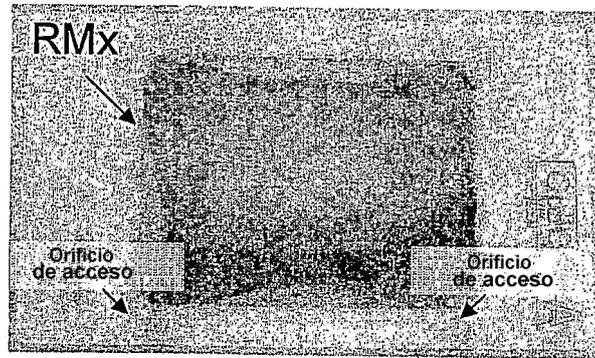


Figura 4. La matriz de regeneración producida a partir de sangre completa carece de cualquier indicio de células intactas o núcleos.



Figura 5. Micrografías electrónicas de la matriz de regeneración producida utilizando sangre coagulada y filtración final por 5 μm . A - 200x, B - 1000x, C - 7500x, D - 7500x.

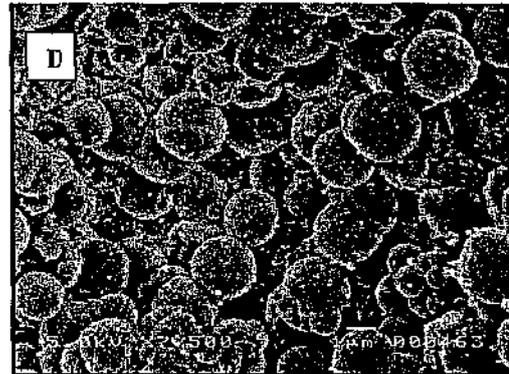
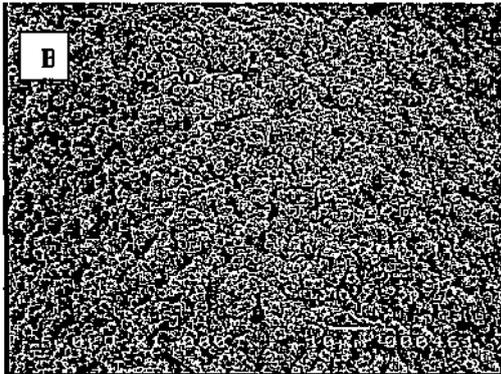
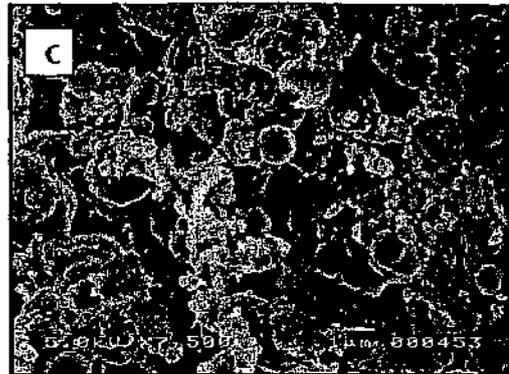
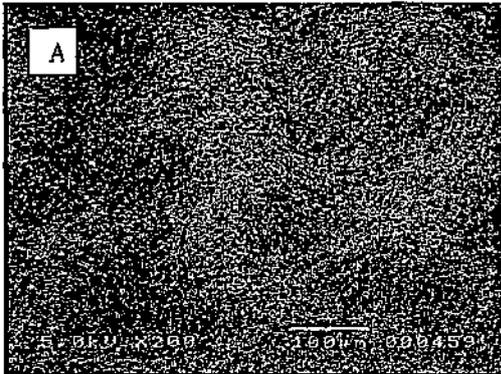


Figura 6. Micrografías electrónicas de barrido de la matriz de regeneración producida utilizando sangre coagulada y filtración final por 1,2 μm (21 días). A - 200x, B - 1000x, C - 7500x, D - 7500x.

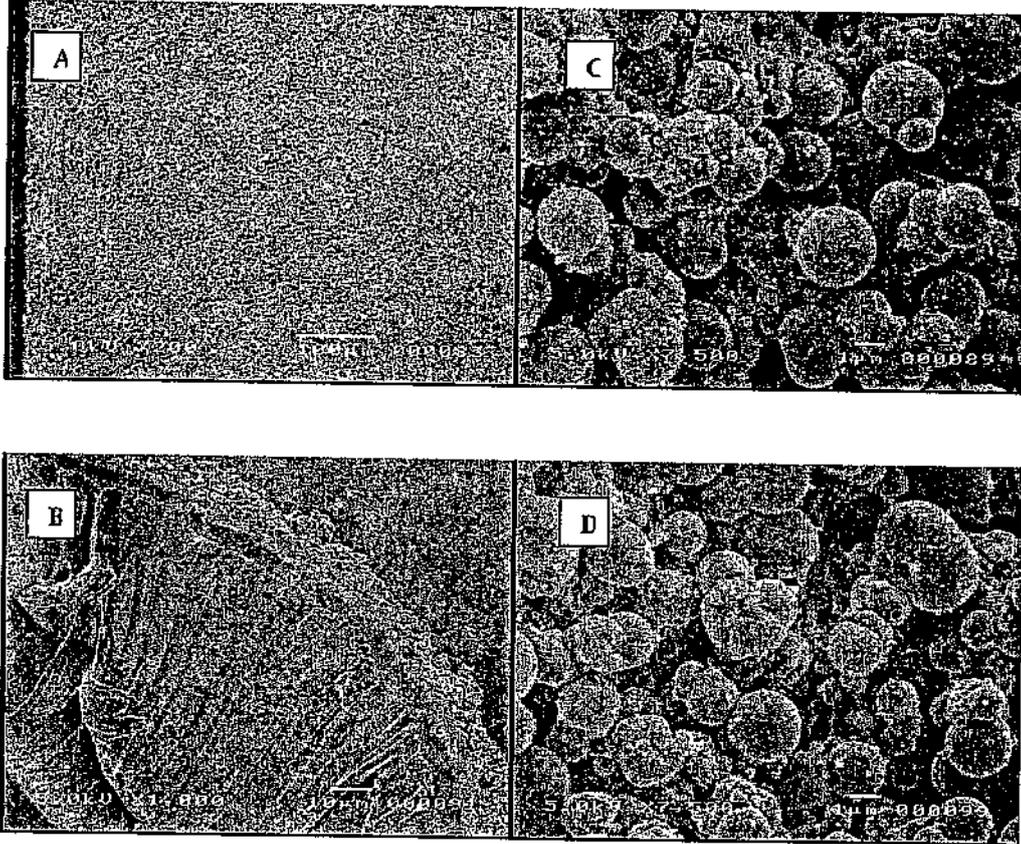


Figura 7. Micrografías electrónicas de la matriz de regeneración producida utilizando sangre no coagulada (utilizando EDTA) y filtración final por 1,2 μm (21 días). A - 200x, B - 1500x, C - 5000x, D - 10000x.

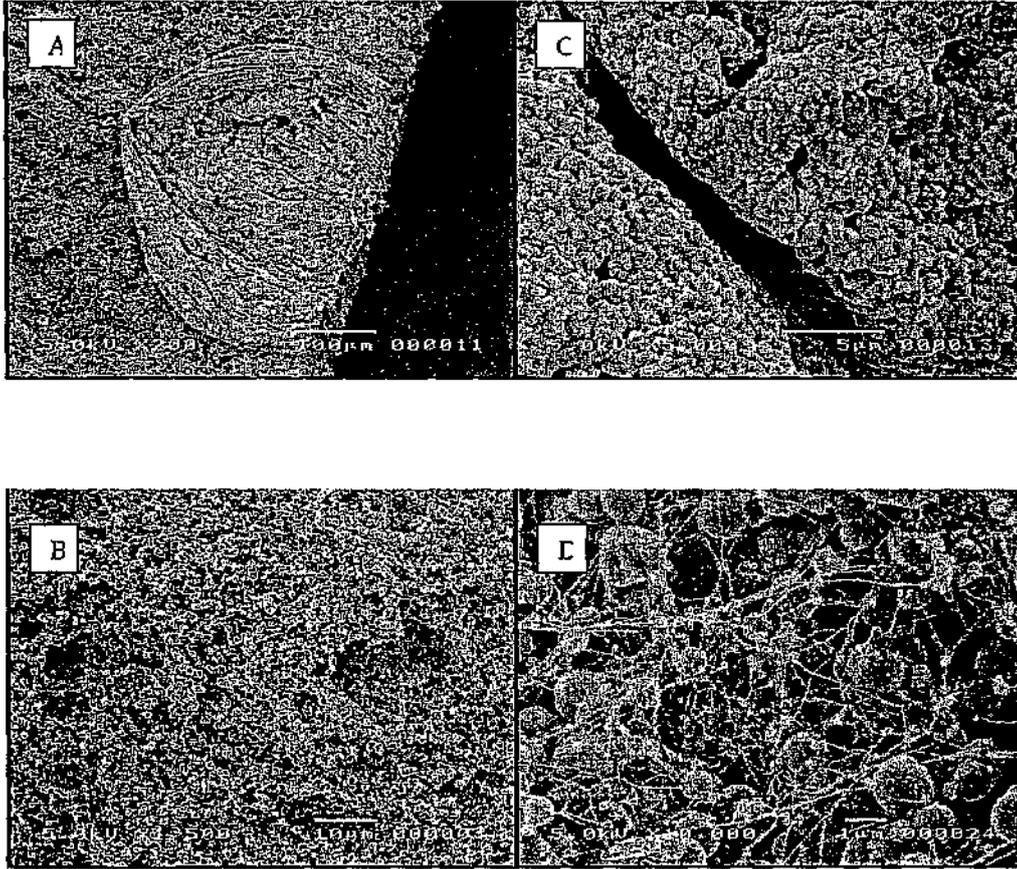


Figura 8. Micrografía óptica de la matriz de regeneración producida utilizando sangre no coagulada y filtración final por 1,2 μm (aumento de 100x).

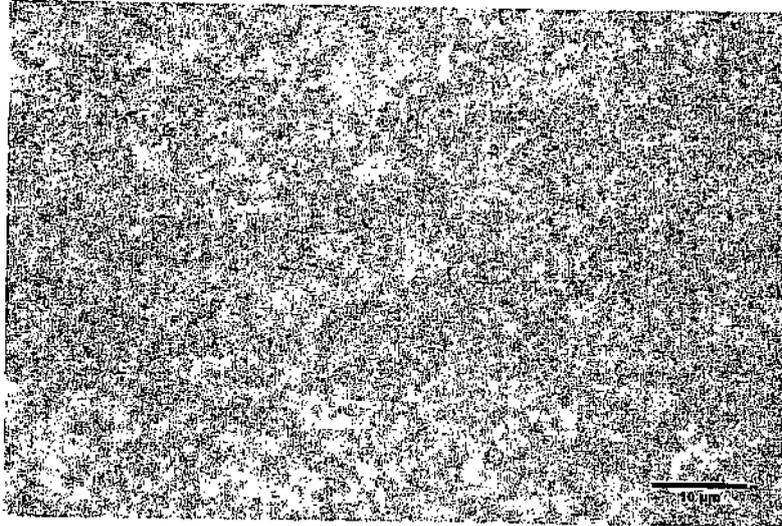
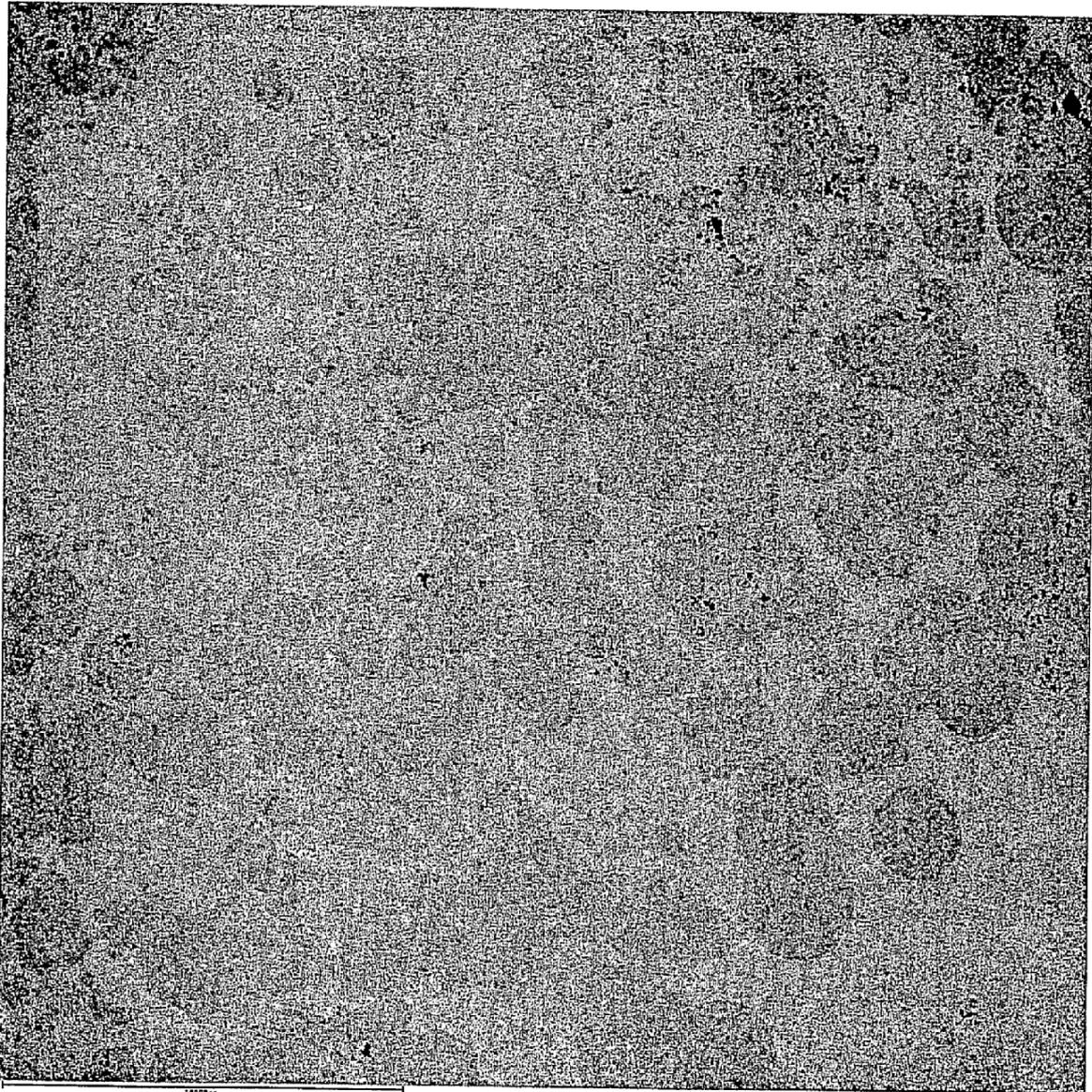


Figura 9. Micrografía electrónica de transmisión de la matriz de regeneración.



01\\Mac\\bnc\\SerafinaL4_016.tif
35-04-2005 02:00:15
Mag = 1200.0
Hum = 107.0

Figura 10. Microscopía electrónica de transmisión de la matriz de regeneración.

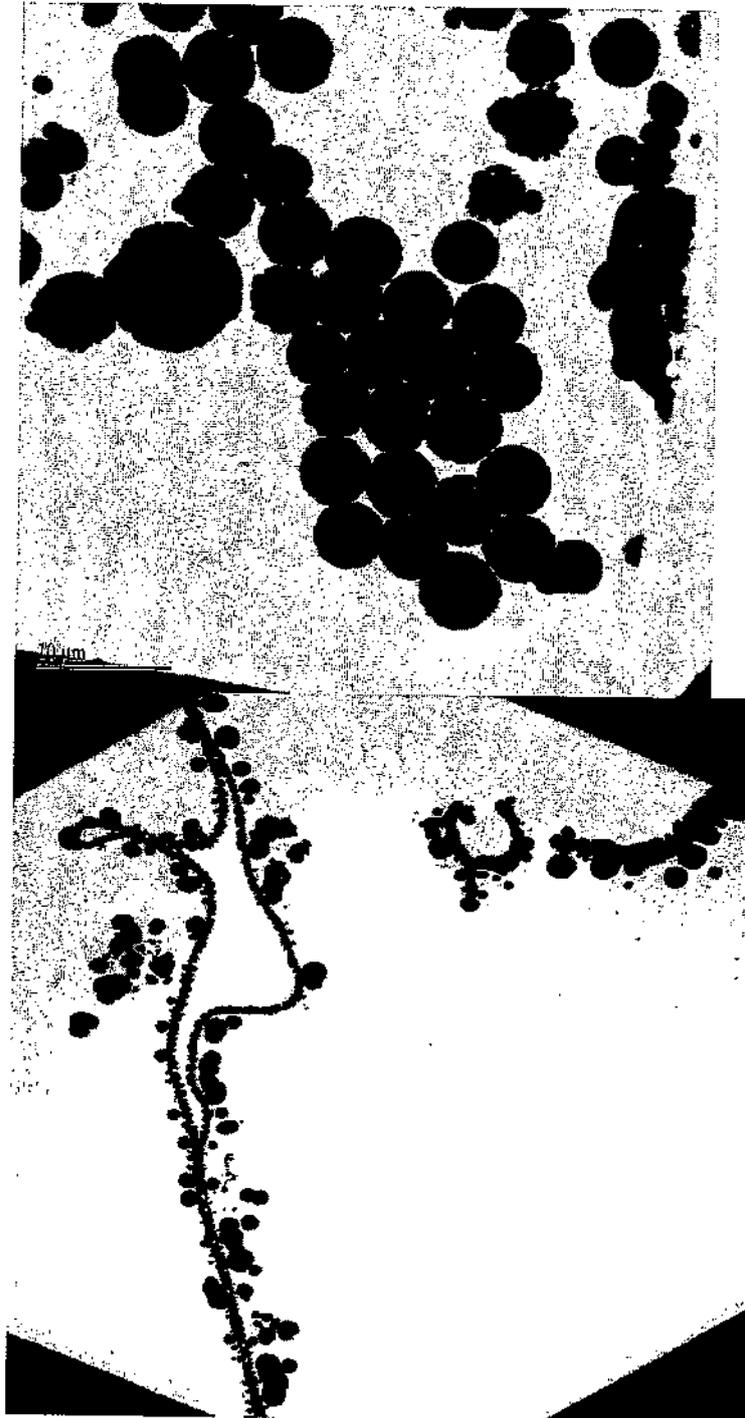


Figura 11. Microscopía electrónica de transmisión de la matriz de regeneración.

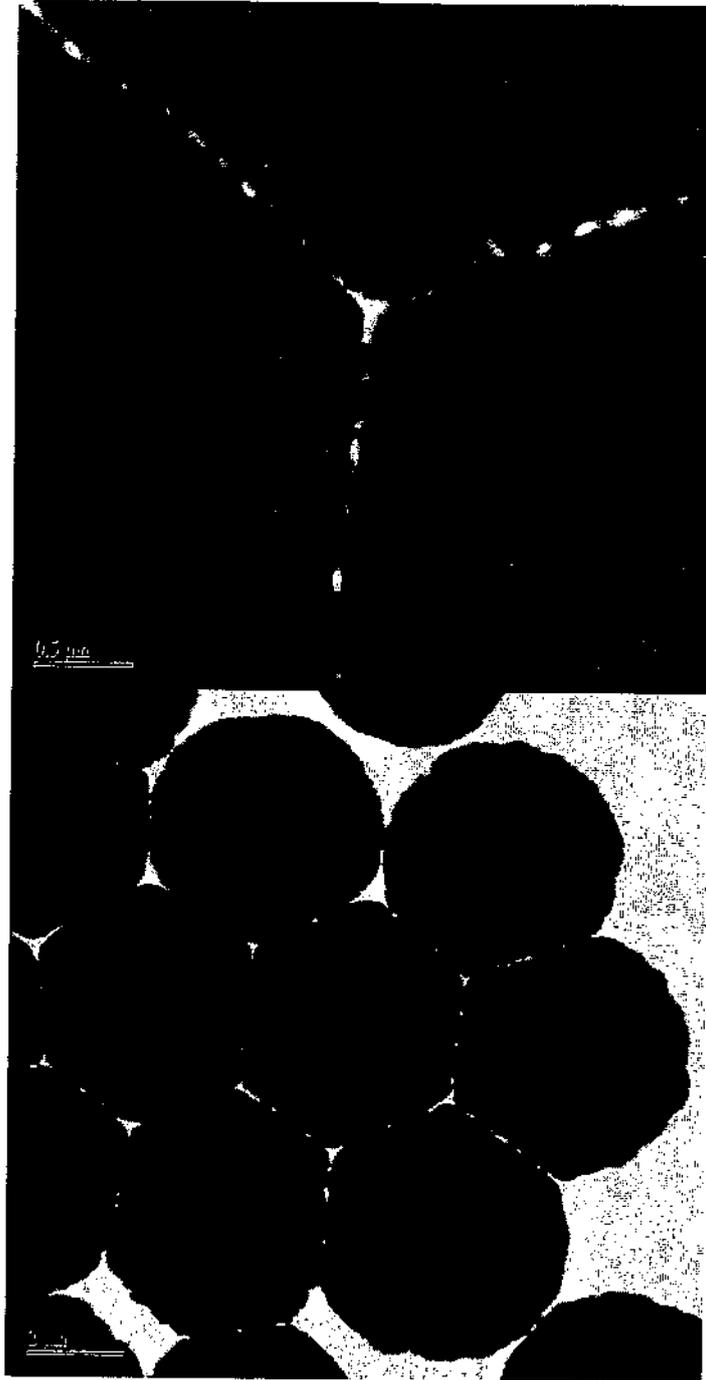


Figura 12. Análisis por SDS-PAGE de la matriz de regeneración.

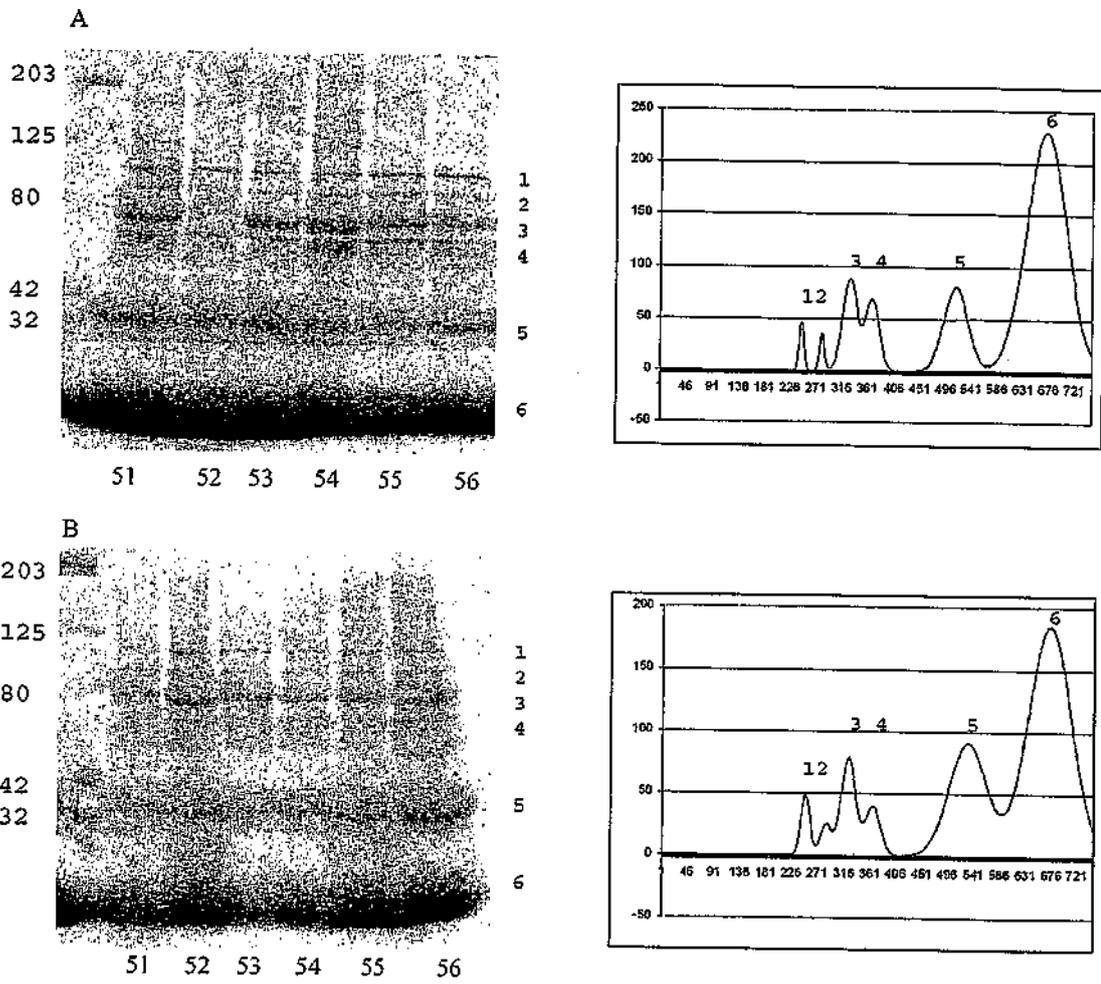


Figura 13. Contenido de ARN total (μg) en la matriz de regeneración, el sobrenadante y el cultivo de Opticell® (filtrado por $1 \mu\text{m}$).

(Nota: en los controles no se aisló ARN de sobrenadante en el día 21)

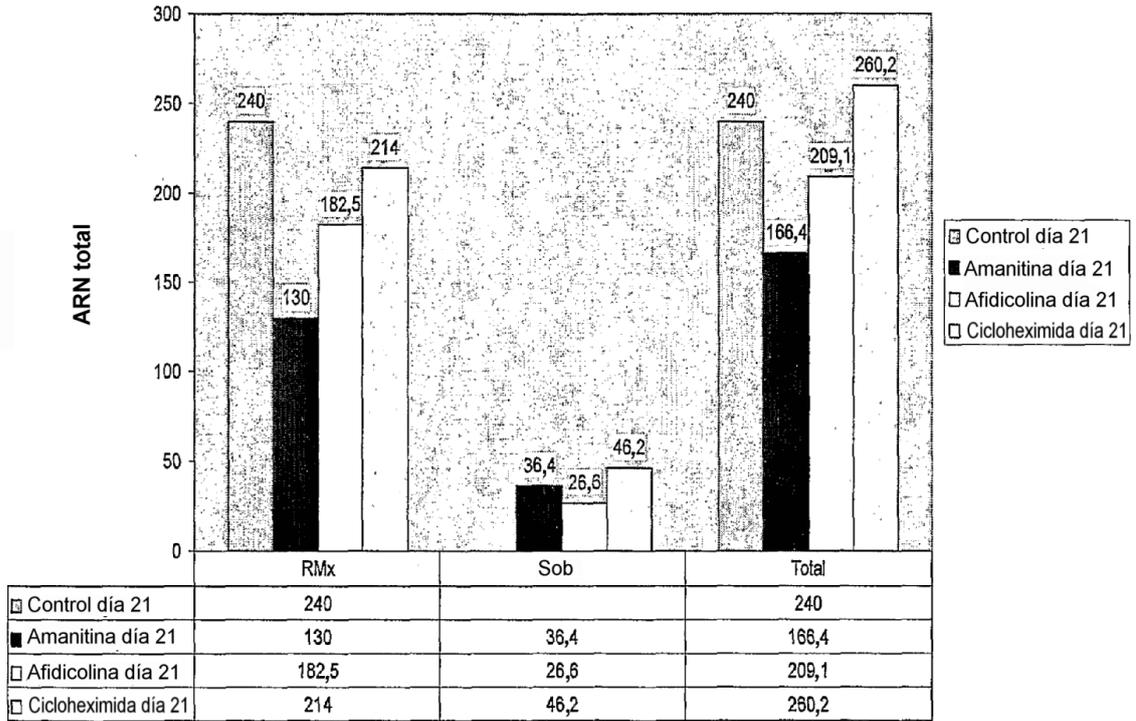


Figura 14. Contenido de proteína total en la matriz de regeneración, el sobrenadante y el cultivo de Opticell® completo (filtrado por 5 µm).

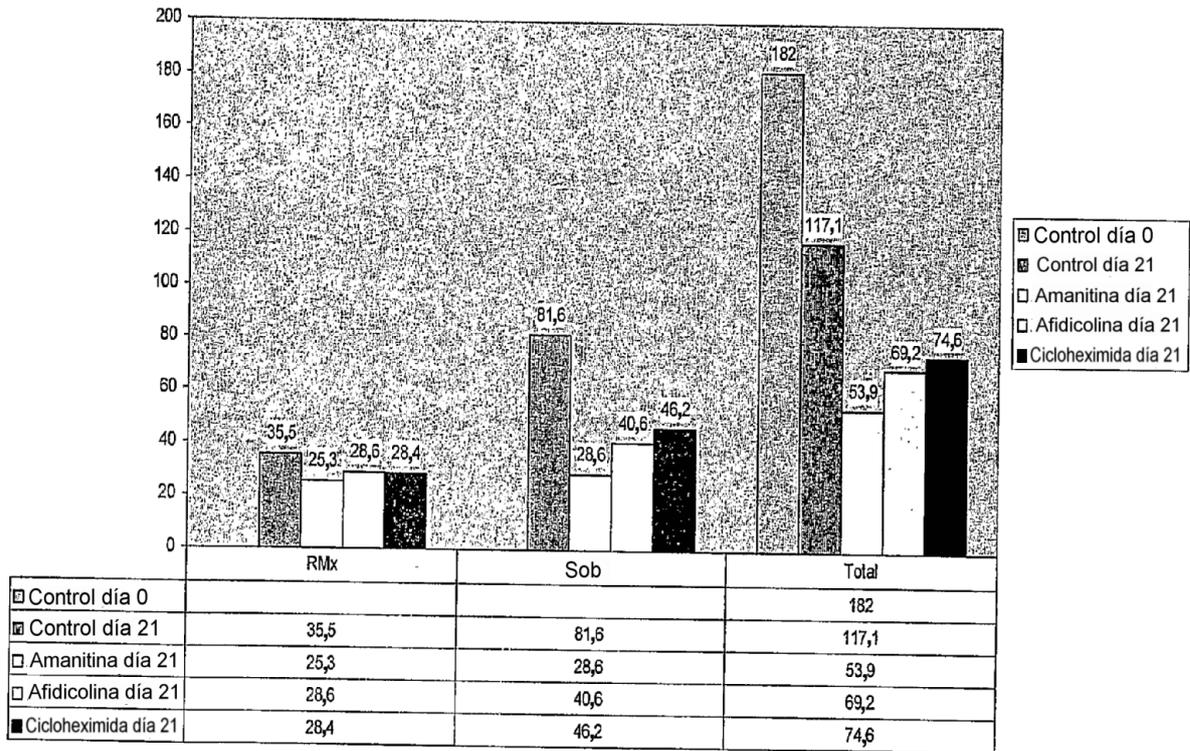


Figura 15. Contenido de proteína total en la matriz de regeneración, el sobrenadante y el cultivo de Opticell® completo (filtrado por 1 µm).

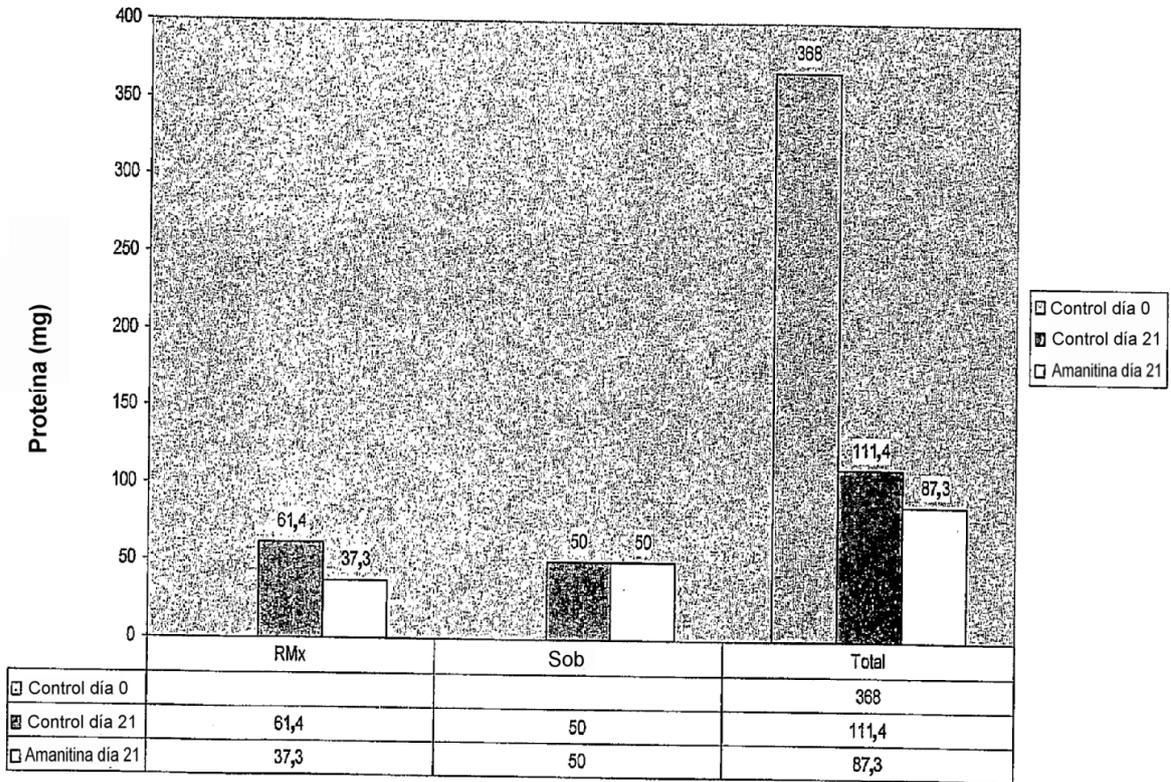


Figura 16. Contenido de lípidos total en la matriz de regeneración, el sobrenadante y el cultivo de Opticell® completo (filtrado por 1 µm).

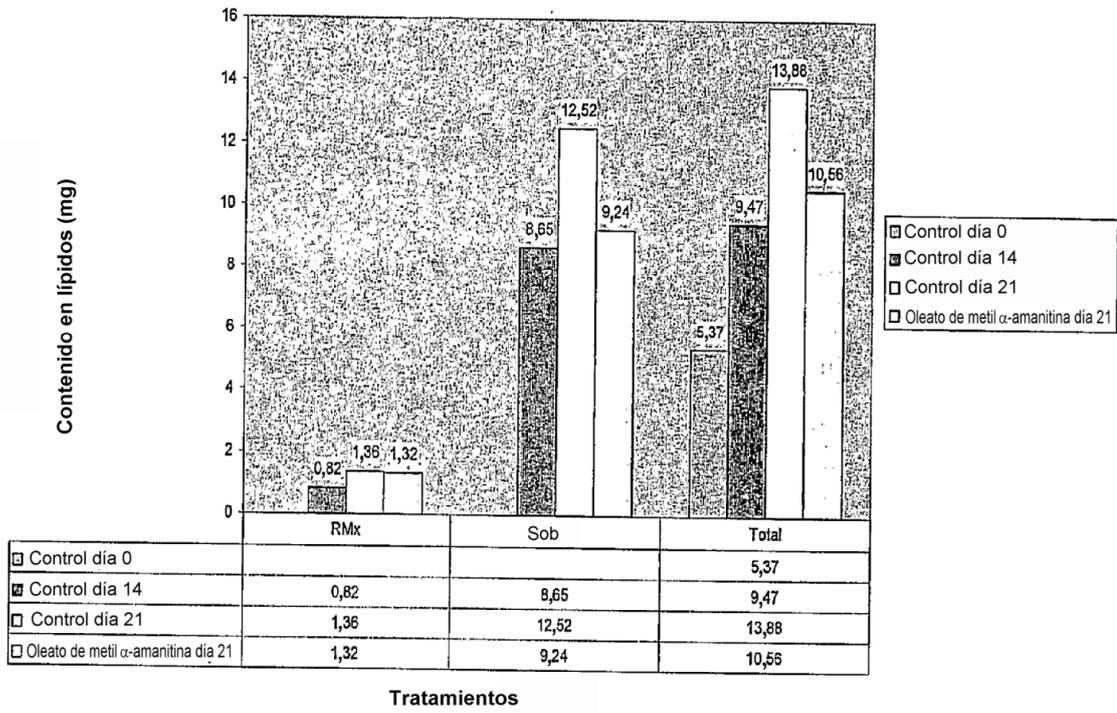


Figura 17. PAGE para la matriz y los medios, comparación de las bandas de proteína teñidas por Coomasie de las matrices filtradas por 1 μ m a filtradas por 5 μ m,

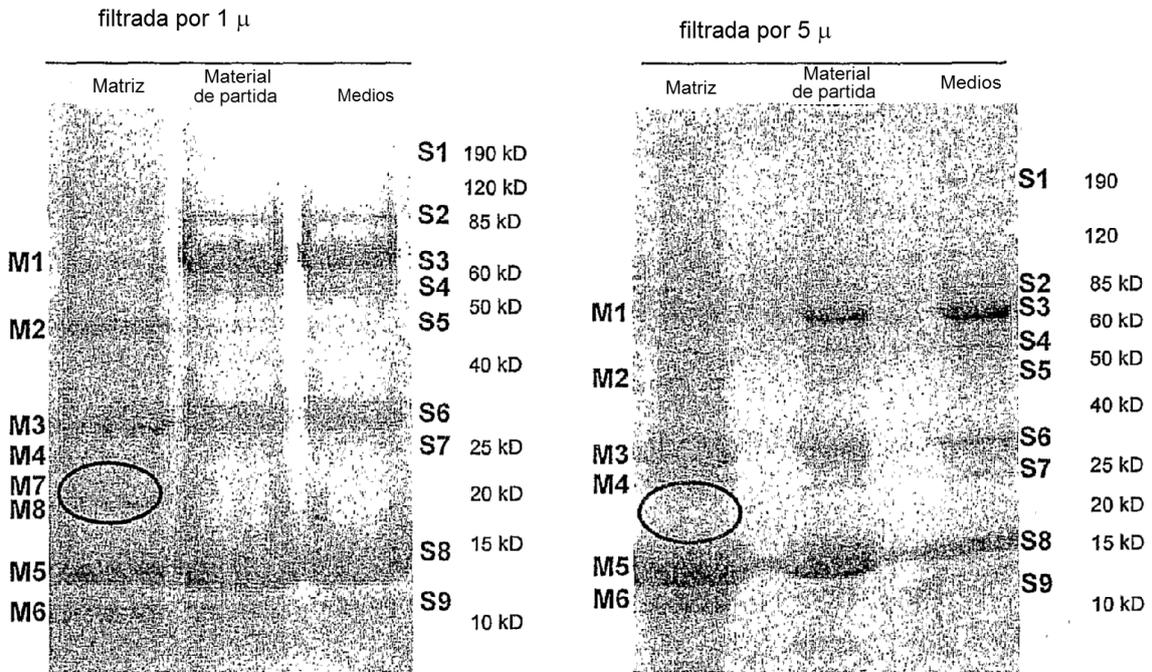
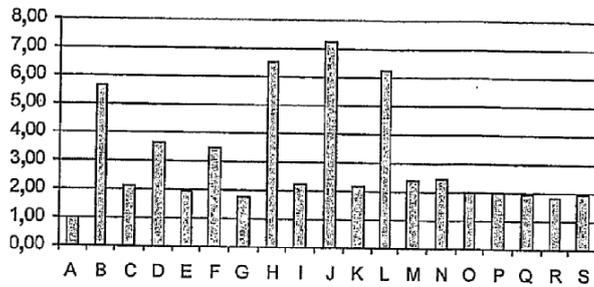
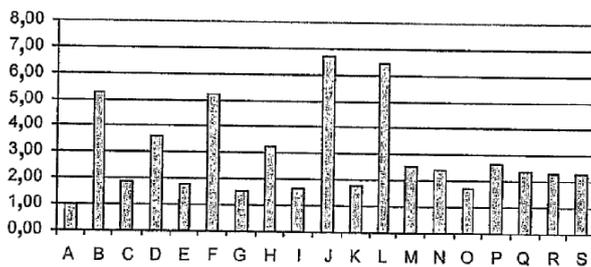


Figura 18. Actividad de regulación positiva de genes neuronales de la matriz de regeneración.

A. NT-3.



B. NCAM-1.



Leyenda

- A = Medio de producción de RM_x completo
- B = Día 12, todos, RM-1
- C = Día 12, todos, SC-1
- D = Día 12, ITS, RM-1
- E = Día 12, ITS, SC-1
- F = Día 12, EGF-ITS, RM-1
- G = Día 12, EGF-ITS, SC-1
- H = Día 12, FGF-ITS, RM-1
- I = Día 12, FGF-ITS, SC-1
- J = Día 12, ninguno, RM-1
- K = Día 12, ninguno, SC-1
- L = Día 12, sin alimento, RM-1
- M = Día 12, sin alimento, SC-1
- N = Día 0, EGF-ITS, Rep-1
- O = Día 0, EGF-ITS, Rep-2
- P = Día 0, FGF-ITS, Rep-1
- Q = Día 0, FGF-ITS, Rep-2
- R = Día 0, ninguno, Rep-1
- S = Día 0, ninguno, Rep-2

C. GAP-43.

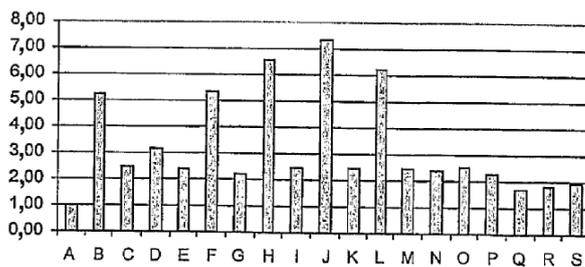


Figura 19. Regulación positiva de genes en veces después de la incubación de la matriz de regeneración (y de la matriz de regeneración inactivada por calor) con células SH-SY5Y.

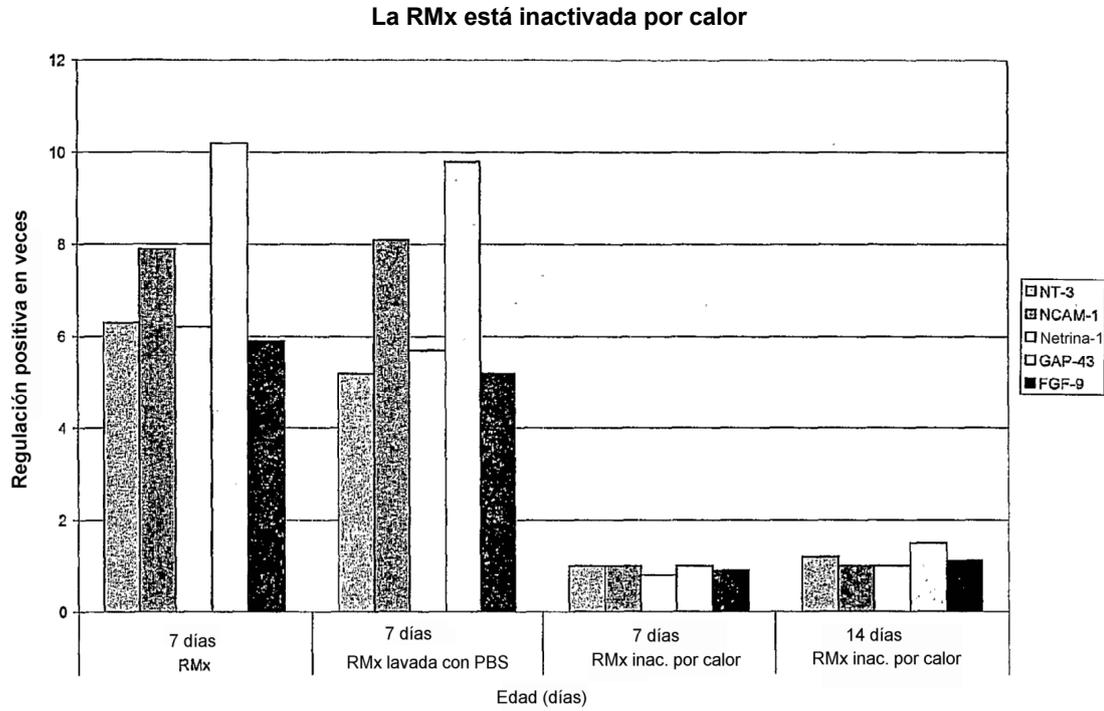


Figura 20. Extensión de neuritas de células Neuroscreen® tratadas con la matriz de regeneración.

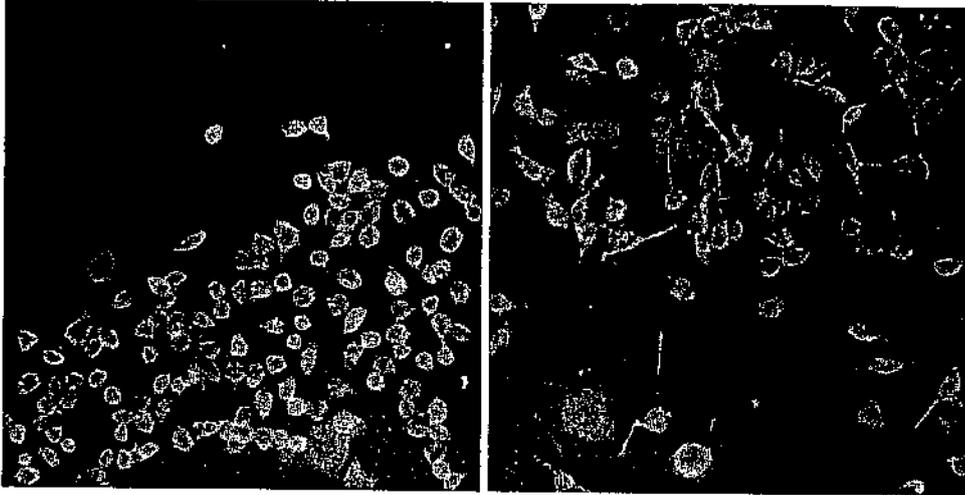


Figura 21. Comparación de la extensión de neuritas de células Neuroscreen® cultivadas en presencia o ausencia de matriz de regeneración.

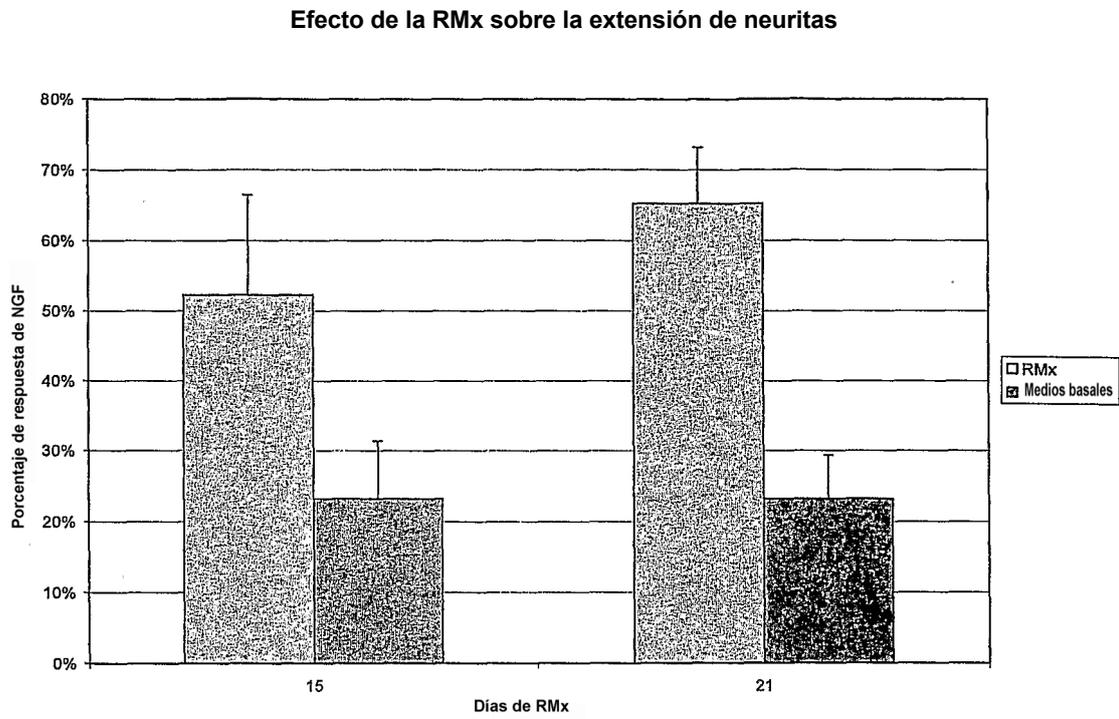


Figura 22. Comparación de la extensión de neuritas de células Neuroscreen® cultivadas en presencia de la matriz de regeneración producida sin complementación de factor de crecimiento.

Efecto de los factores de crecimiento sobre la actividad de la RMx

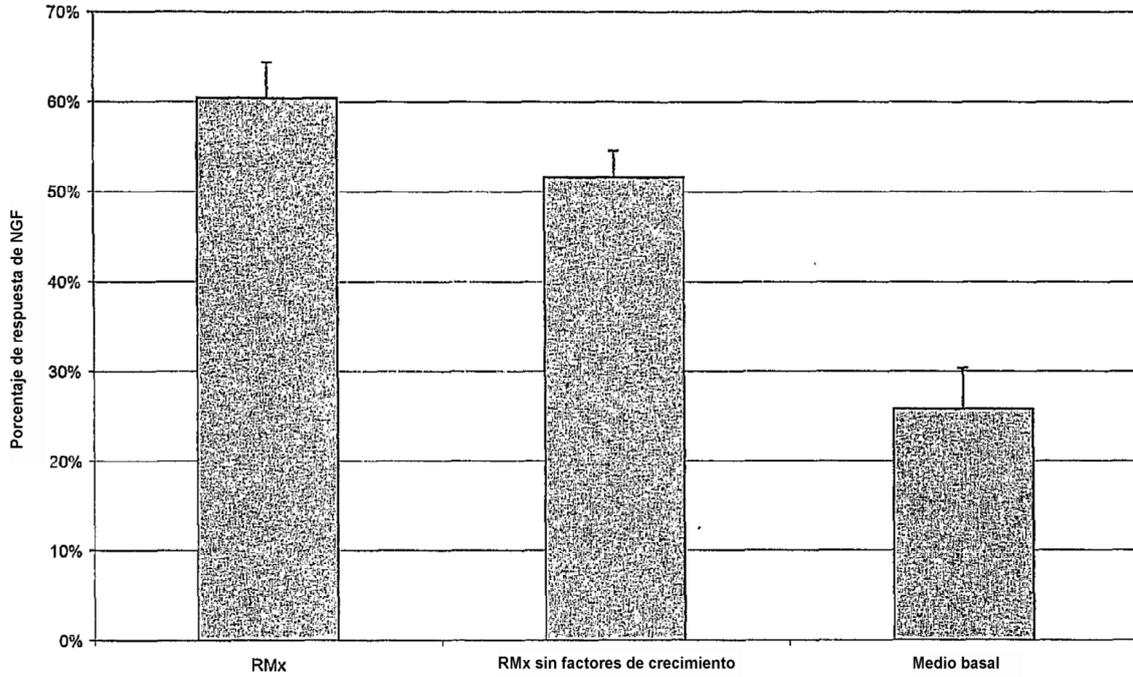


Figura 23. Respuesta a la dosis de NGF.

Respuesta a la dosis de NGF

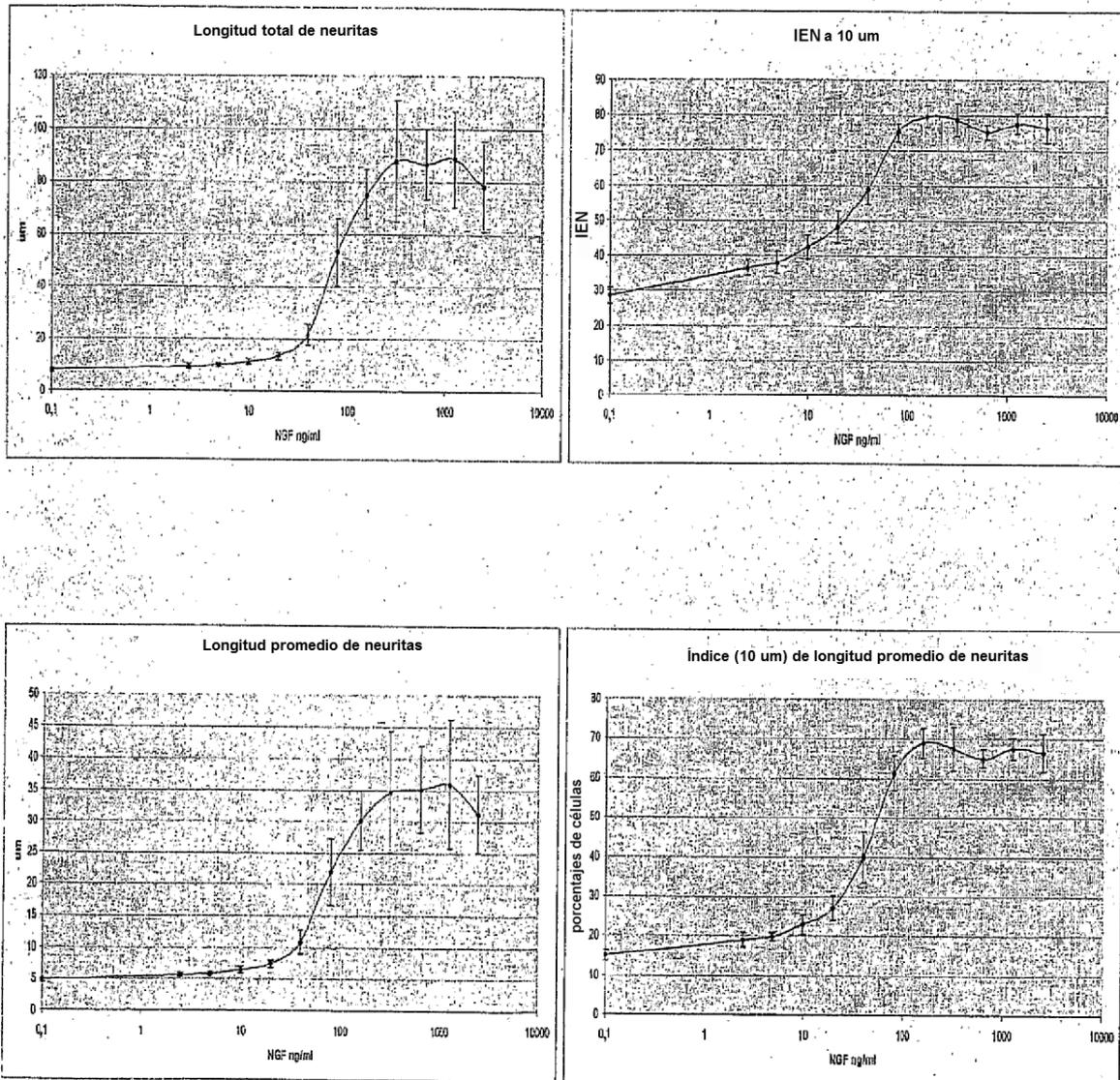
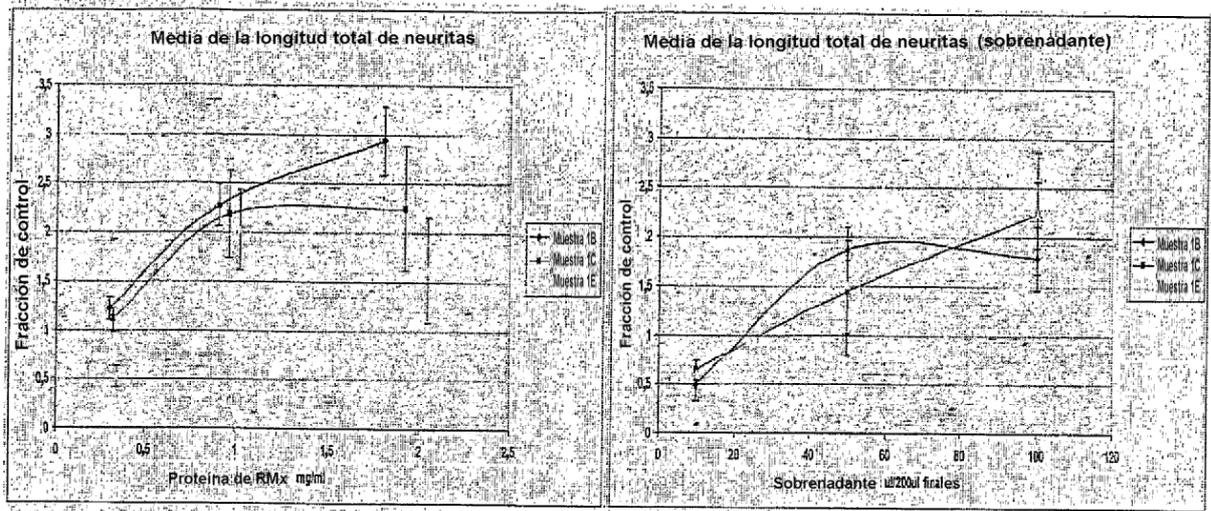
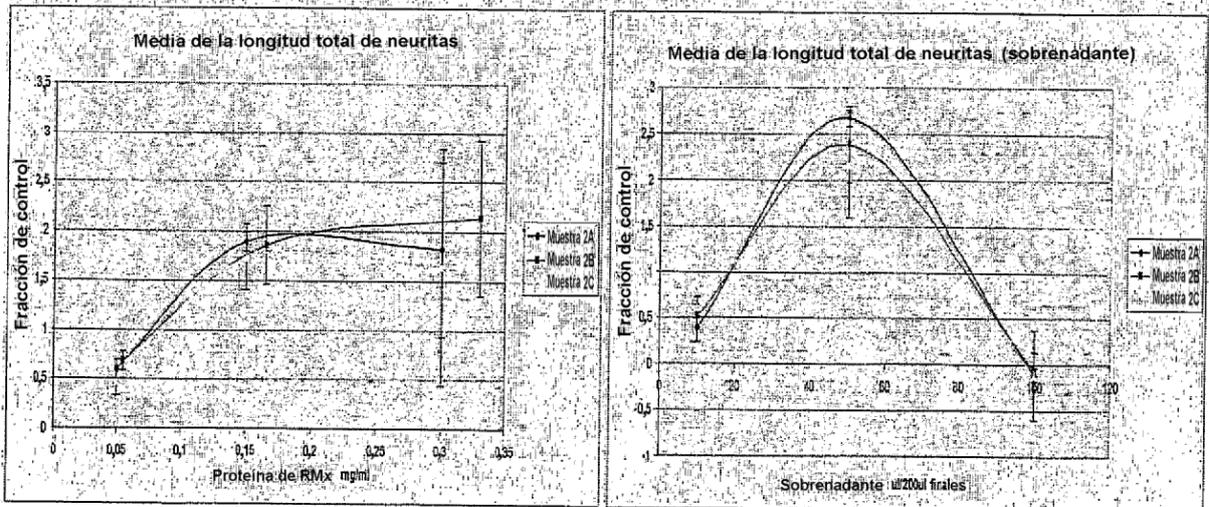


Figura 24. Longitud total de neuritas.

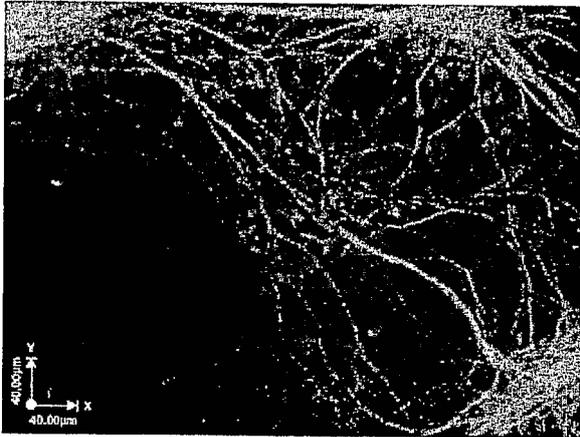


Sangre completa



Fracción plasmática - plaquetaria - leucocitaria

Figura 25. Células de médula espinal embrionaria de rata primarias de control, marcadas para tubulina neuronal (Tuj1) y glía (GFAP), seis días después del inicio del cultivo de células en suspensión individual (dos exposiciones para mostrar todos los componentes teñidos).



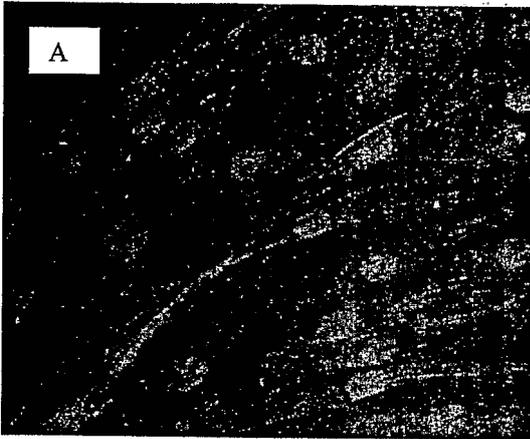
Neuronas Tuj1



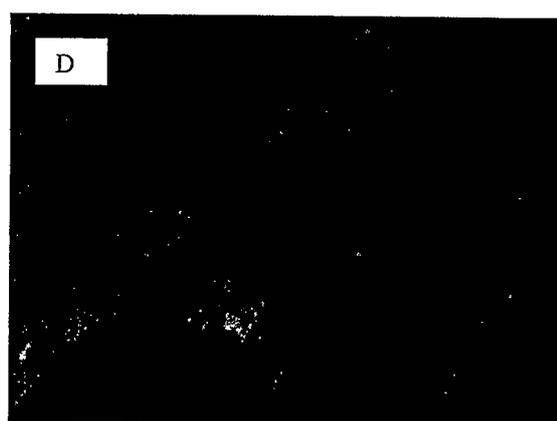
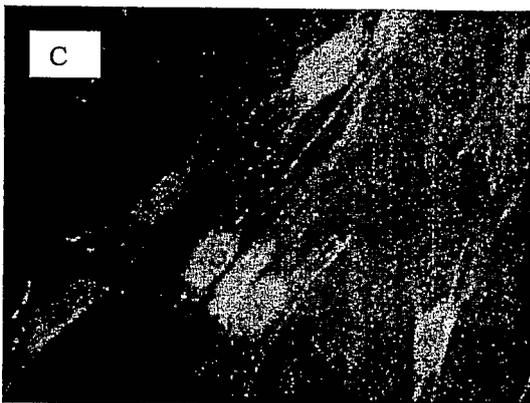
Astrocitos GFAP

Figura 27. Inmunocitoquímica de fibroblastos humanos cultivados en el medio de producción de la matriz de regeneración y con matriz de regeneración.

Medio de la matriz de regeneración (control)



Matriz de regeneración



β -tubulina

F-actina

Figura 26. Interacción de células neuronales con matriz de regeneración de siete días.

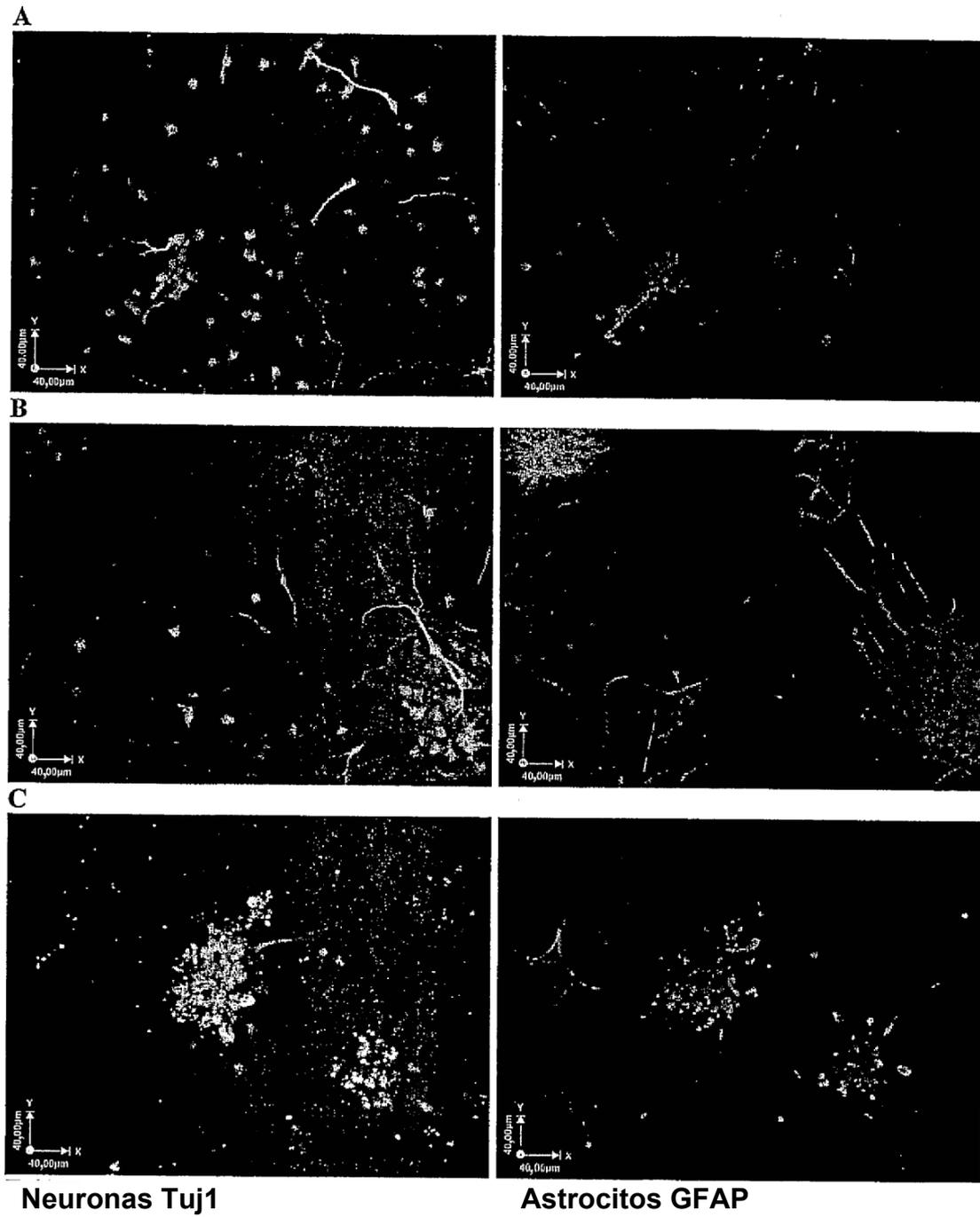
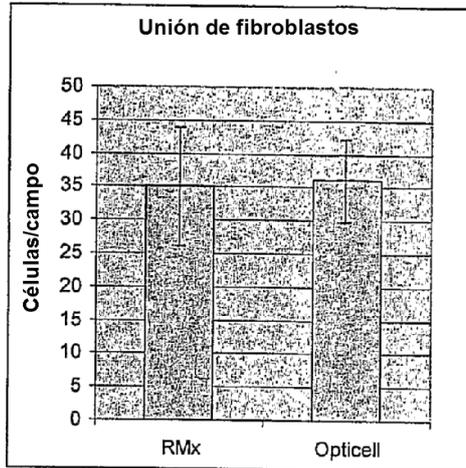
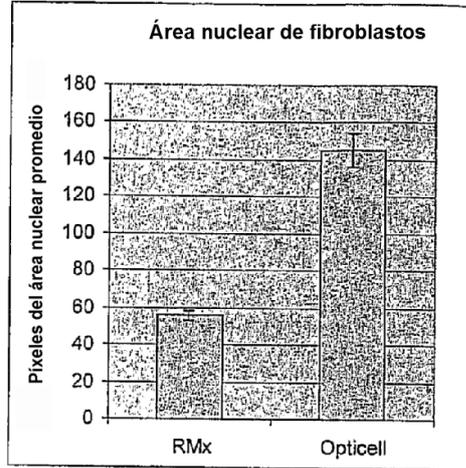


Figura 28. Efecto de la matriz de regeneración sobre la unión de fibroblastos, el área nuclear de fibroblastos y el % de fibroblastos positivos para BrdU.

A.



B.



C.

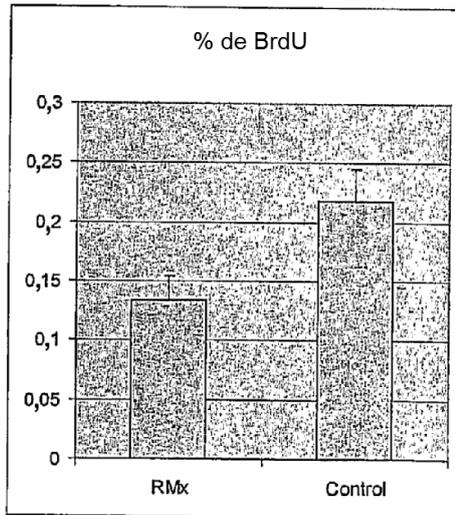


Figura 29. El implante de la matriz de regeneración en un modelo de sección completa (5 mm) de LME de rata induce el restablecimiento de la función motora.

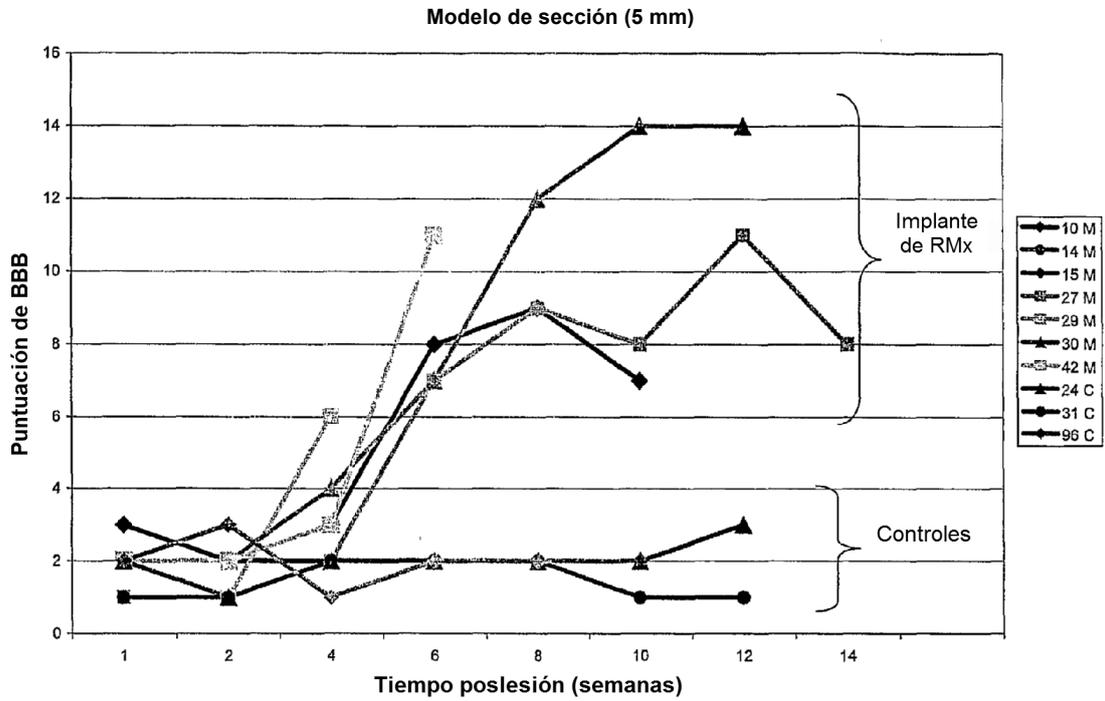


Figura 30. Incidencia disminuida de la formación de quistes en un modelo de sección de lesión de médula espinal de rata, para ratas que reciben un implante de matriz de regeneración.

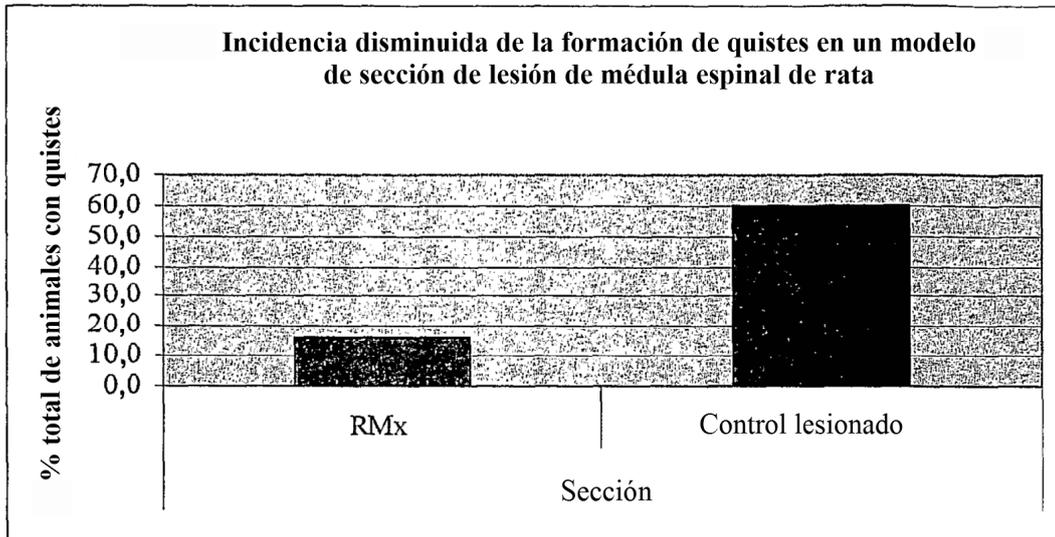


Figura 31. El implante de la matriz de regeneración en un modelo de hemisección (5 mm) de LME de rata induce el restablecimiento de la función motora.

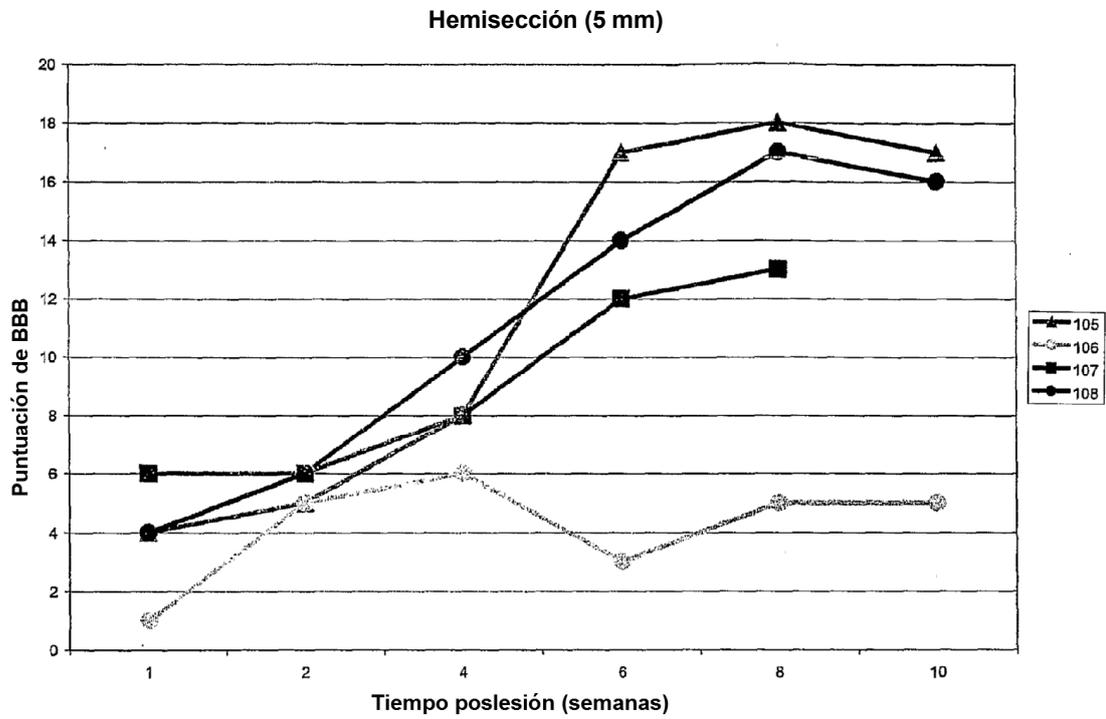


Figura 32A. Restablecimiento funcional después del implante de RMx en la médula espinal de ratas que tenían una sección completa de 5 mm.

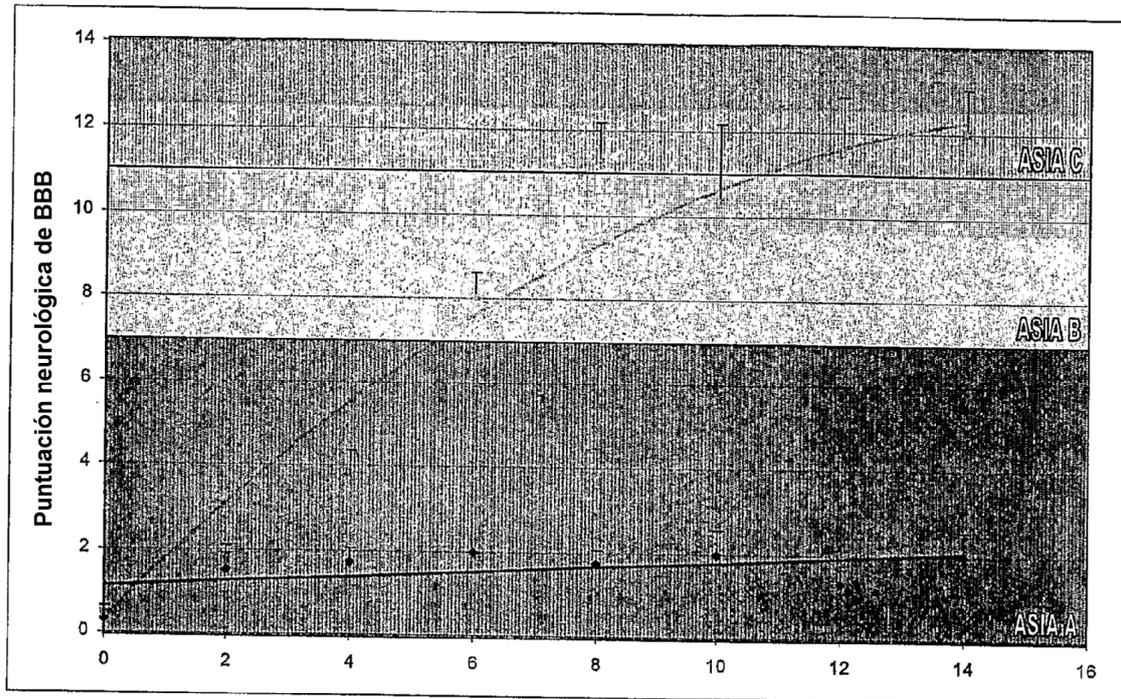


Figura 32B. Restablecimiento funcional después del implante de la matriz de regeneración en médula espinal de ratas 2 semanas después de la lesión por contusión (50 mm).

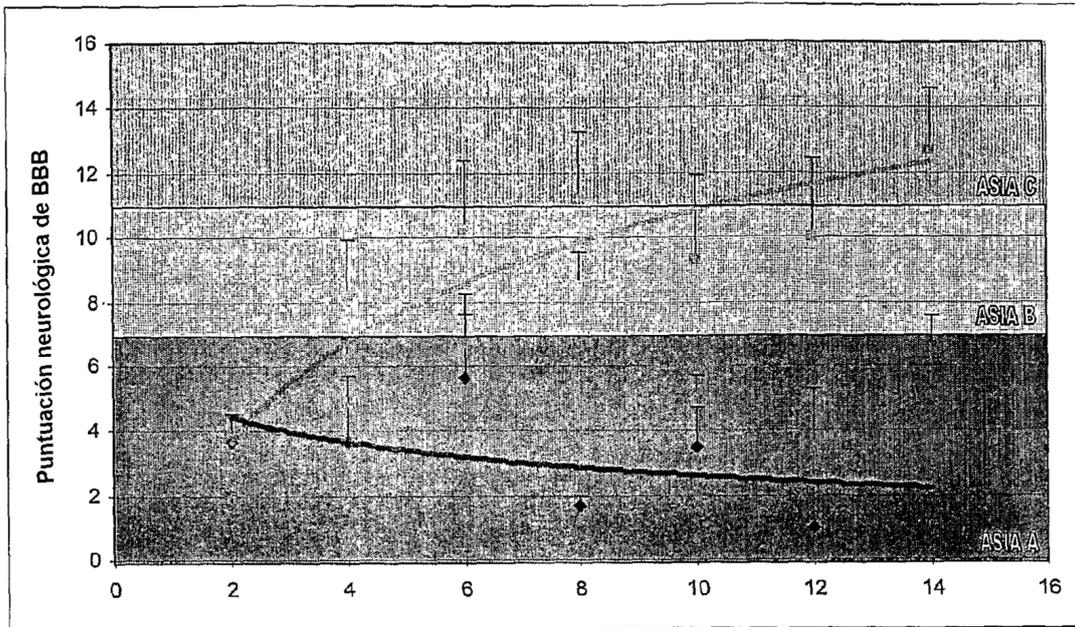


Figura 32C. Modelo de combinación (sección completa y contusión) que indica la eficacia de una matriz de regeneración en el tratamiento de la lesión de médula espinal.

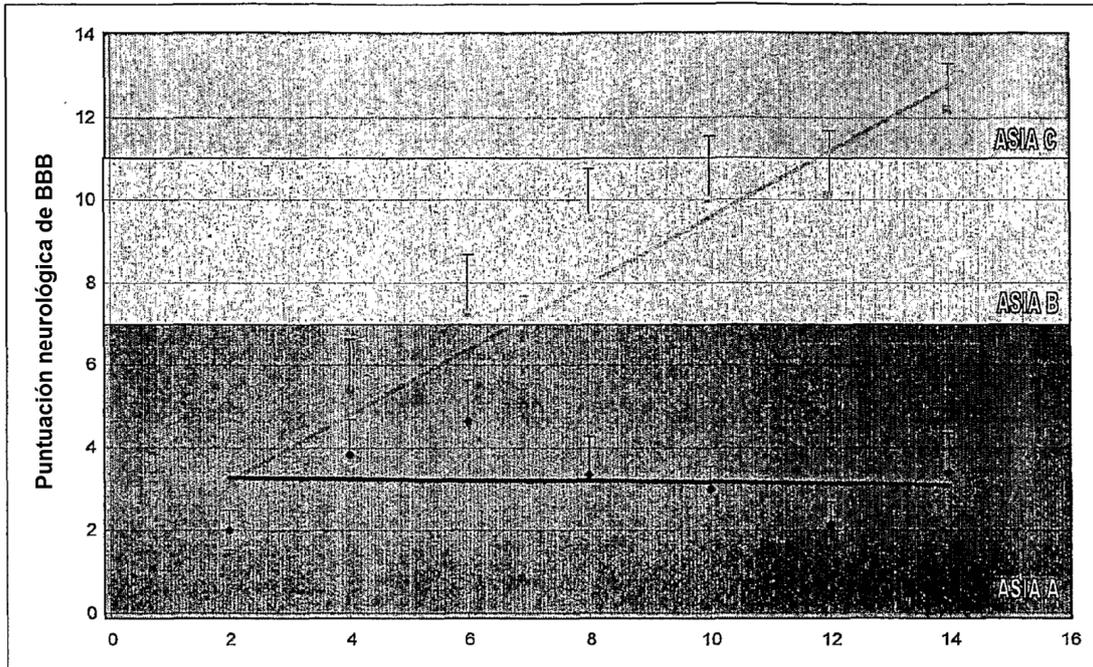


Figura 33. El implante de la matriz de regeneración induce el restablecimiento de la función motora en lesiones de médula espinal de cerdos provocada por impacto y/o hemisección quirúrgica (que incluye la extracción de 5 mm de médula espinal).

Error!

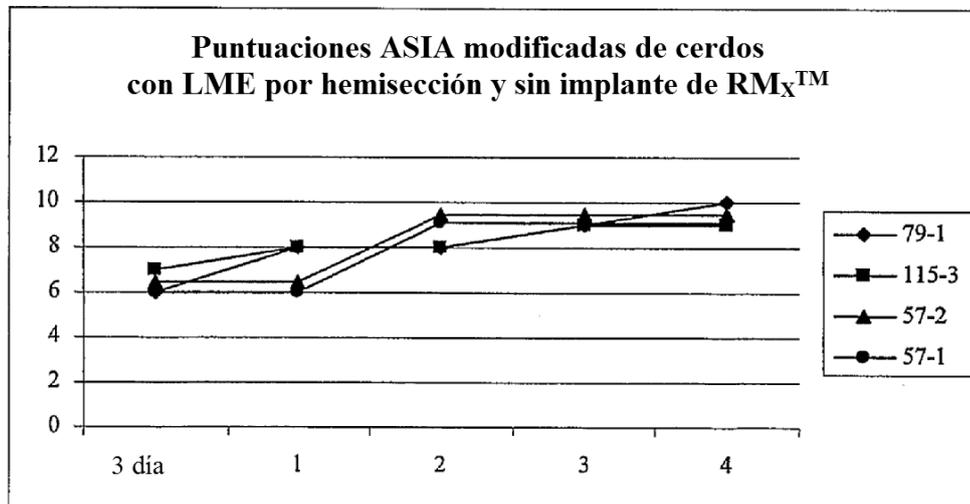
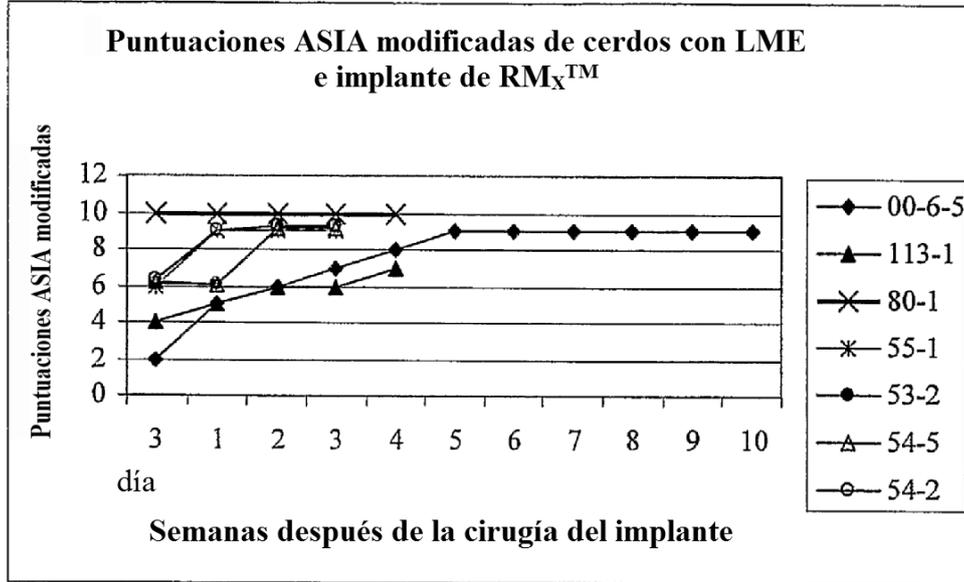


Figura 34.

Comparación de los pesos medios y de las ganancias de peso medias en cerdos implantados con RMx o coágulos de sangre humana homogeneizados

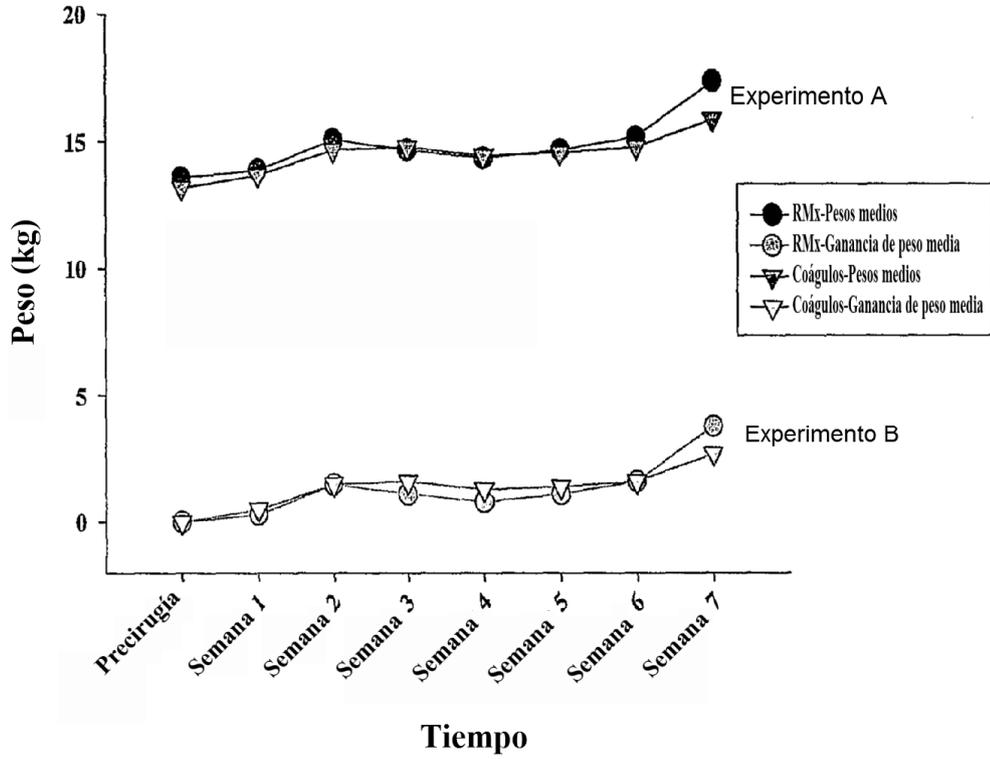


Figura 35.

Comparación de los restablecimientos de las capacidades motoras del lado derecho en cerdos implantados con RMx o coágulo de sangre humana tras lesiones de médula espinal por sección parcial

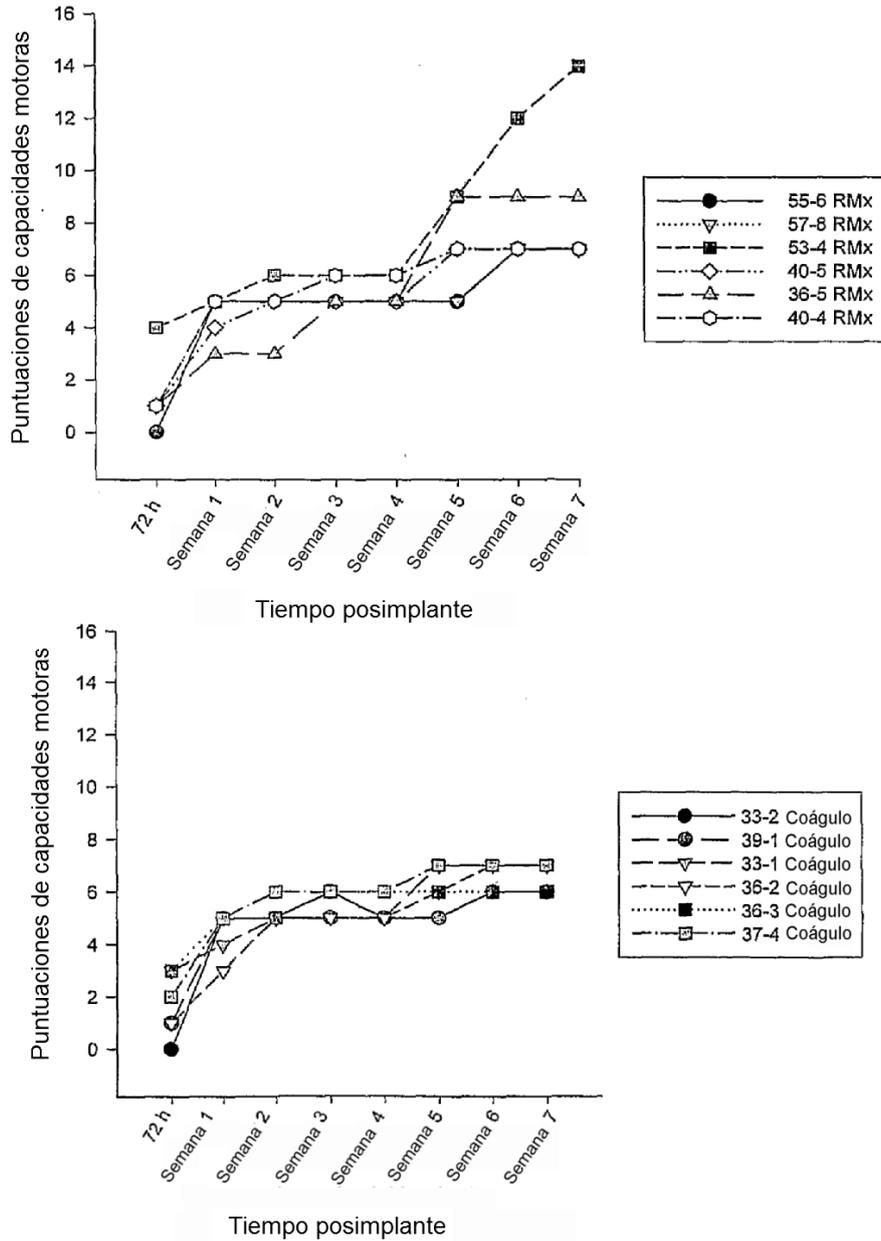


Figura 36. Comparación del restablecimiento locomotor en cerdos tratados con matriz de regeneración humana o con coágulo de sangre a las 7 semanas después de la LME.

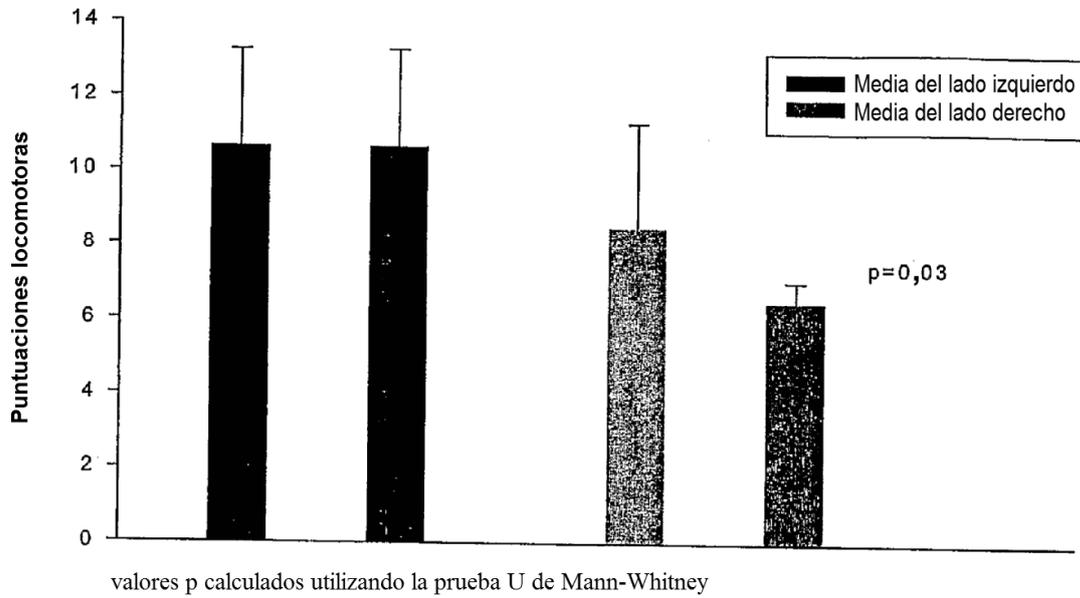


Figura 37. Neuronas de formación reciente (marrón) en el sitio de lesión de médula espinal en un cerdo, 1 mes después del implante de la matriz de regeneración, mostrado con un aumento de 200x.

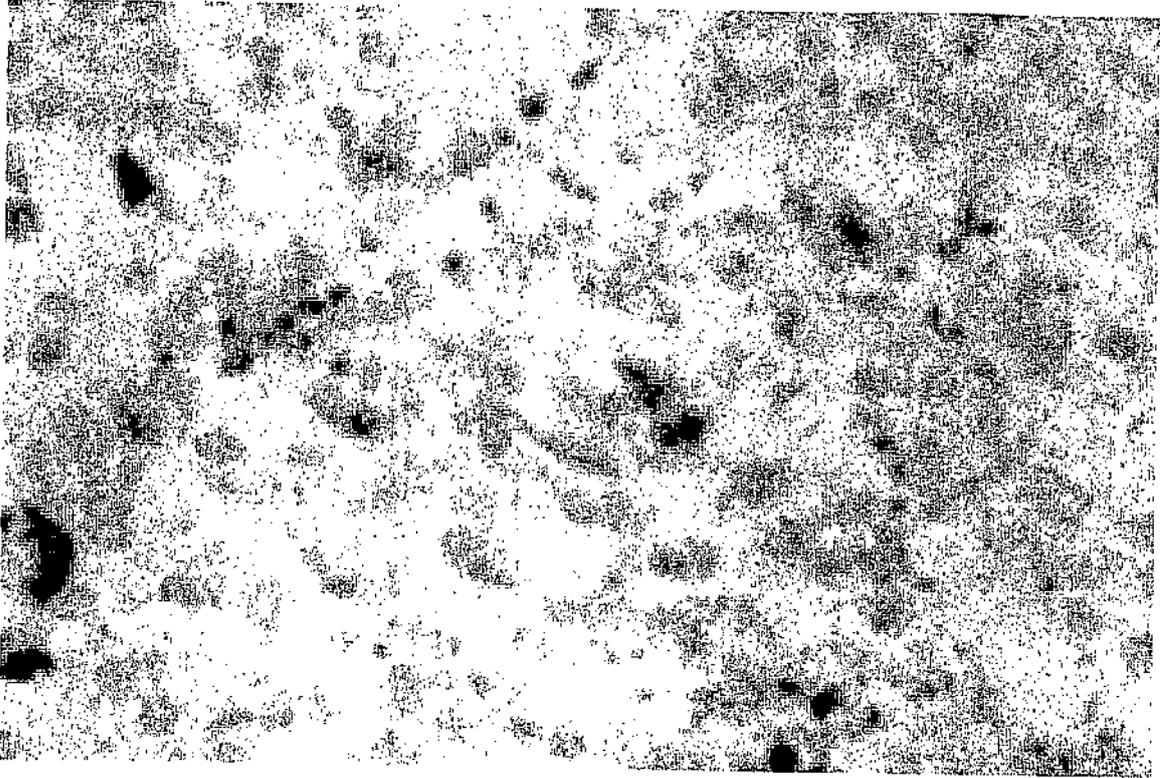
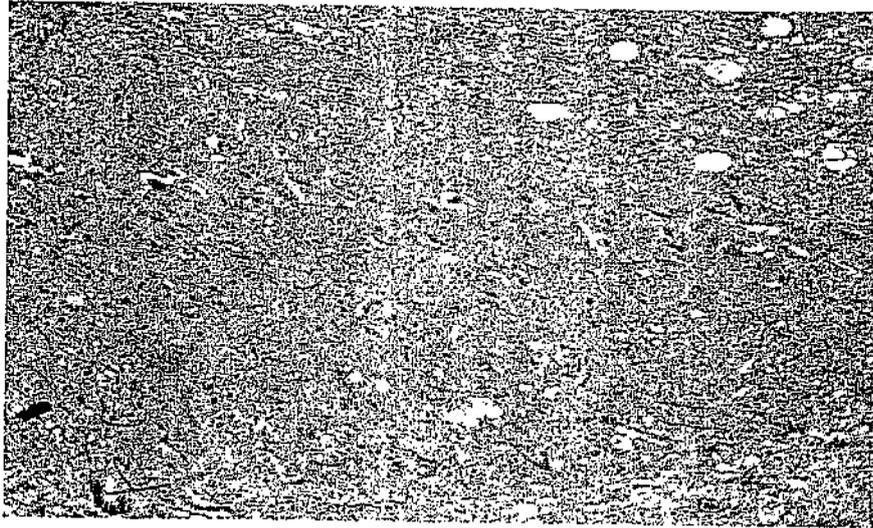


Figura 38. Evaluación microscópica de un corte longitudinal procedente de un estudio de regeneración de médula espinal de rata.

A.



B.

