

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 815**

51 Int. Cl.:

**A01N 63/00** (2006.01)

**A61K 35/12** (2015.01)

**A61K 35/32** (2015.01)

**A61K 35/44** (2015.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.10.2002 PCT/US2002/33456**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.04.2003 WO03032735**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.10.2002 E 02801789 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018 EP 1446015**

54 Título: **Remodelación de tejidos y órganos**

30 Prioridad:

**18.10.2001 US 347913 P**

**25.07.2002 US 398448 P**

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

**18.06.2018**

73 Titular/es:

**LIFECCELL CORPORATION (50.0%)**

**1 MILLENNIUM WAY**

**BRANCBURG, NJ 08876-3876, US y**

**WRIGHT MEDICAL TECHNOLOGY, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LIVESEY, STEPHEN, A.;**

**MCQUILLAN, DAVID, J.;**

**BENIKER, HERBERT, DANIEL;**

**BOERBOOM, LAWRENCE, E. y**

**HAGGARD, WARREN, O.**

74 Agente/Representante:

**FORTEA LAGUNA, Juan José**

ES 2 672 815 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**

Remodelación de tejidos y órganos

**5 CAMPO TÉCNICO**

Esta invención se refiere a una composición para uso en ingeniería, y más particularmente a la remodelación de tejidos según se define en las reivindicaciones.

**10 ANTECEDENTES**

Debido a los problemas inherentes al trasplante de tejidos alogénicos o xenogénicos intactos, es crucial que se desarrollen estrategias alternativas para reemplazar o reparar tejidos defectuosos o dañados.

15 Las Patentes de Estados Unidos N.º 4.865.871 y 5.366.616 y las solicitudes de Estados Unidos con N.º de serie 09/762.174 y 10/165.790 en tramitación junto con la presente se citan en el presente documento.

**RESUMEN**

20 La invención se basa en las observaciones de que una matriz dérmica acelular implantada en defectos de hueso y cartílago se remodeló en ambos tejidos. A la luz de este hallazgo, y la capacidad de una amplia gama de células madre diferenciadas, excluidas las células madre de origen embrionario humano y las células progenitoras para poblar matrices injertadas, es probable que las matrices acelulares derivadas de una amplia diversidad de tejidos a base de colágeno serán útiles en la reparación de múltiples tejidos defectuosos o dañados.

25 Más específicamente, la composición para su uso en el procedimiento proporciona un método de tratamiento. Este procedimiento implica: (a) identificar un sujeto mamífero con un órgano receptor, o tejido, que necesita reparación o mejora; y (b) colocar una composición que comprende una matriz acelular no particulada fabricada a partir de un tejido donado a base de colágeno en o sobre el órgano o tejido receptor. El órgano o tejido receptor puede ser piel, hueso, cartílago, menisco, dermis, miocardio, periostio, arteria, vena, estómago, intestino delgado, intestino grueso, diafragma, tendón, ligamento, tejido neural, músculo estriado, músculo liso, vejiga, uréter, uretra o fascia de la pared abdominal. Además, el órgano o tejido receptor es diferente del órgano o tejido a base de colágeno donado. El órgano o tejido receptor puede ser periostio que está asociado con un defecto crítico en la brecha del hueso. El órgano o tejido a base de colágeno puede ser, por ejemplo, dermis, fascia, cordón umbilical, placenta, válvula cardiaca, ligamento, tendón, arteria, vena, tejido conectivo neural o uréter, y el sujeto mamífero puede ser un ser humano. La composición también puede contener células viables histocompatibles con el sujeto, por ejemplo, células obtenidas del sujeto mamífero. Estas células son, por ejemplo, células epidérmicas, queratinocitos, fibroblastos de células endoteliales, células madre embrionarias de origen no humano, células madre mesenquimales adultas o embrionarias de origen embrionario no humano, células madre de cordón umbilical, procondroblastos, condroblastos, condrocitos, pro-osteoblastos, osteocitos, osteoclastos, monocitos, pro-cardiomioblastos, pericitos, cardiomioblastos, cardiomiocitos, células epiteliales gingivales, o células madre del ligamento periodontal. El procedimiento puede implicar además la administración al sujeto de uno o más agentes, por ejemplo, un factor de crecimiento celular, un factor angiogénico, un factor de diferenciación, una citocina, una hormona y una quimiocina. Tales agentes pueden estar en la composición colocada en o sobre el órgano o tejido receptor o pueden inyectarse o infundirse en el sujeto mamífero por separado de la composición. Además, los agentes pueden administrarse administrando al sujeto uno o más vectores de expresión que contienen una o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican el o los agentes, estando cada una de la o las secuencias de ácidos nucleicos unidas operativamente a un elemento regulador transcripcional o traduccional. Estos vectores de expresión pueden estar en una o más células que se administran al sujeto. La o las células pueden estar en la composición o pueden administrarse al sujeto por separado de la composición. Se incluye por la invención otra composición para su uso en un método de tratamiento. Este método implica:

55 (a) identificar un sujeto mamífero con un órgano receptor, o tejido, que necesita reparación o mejora; y (b) colocar una composición que contiene una matriz acelular particulada fabricada a partir de un órgano o tejido donado a base de colágeno en o sobre el órgano o tejido receptor. El órgano o tejido receptor puede ser piel, hueso, cartílago, menisco, dermis, miocardio, estómago, intestino delgado, intestino grueso, diafragma, tendón, ligamento, tejido neural, músculo estriado, músculo liso, vejiga, o encía. Además, el órgano o tejido receptor es diferente del órgano o tejido donado a base de colágeno. El órgano o tejido a base de colágeno puede ser, por ejemplo, dermis, fascia, cordón umbilical, placenta, válvula cardiaca, ligamento, tendón, arteria, vena, tejido conectivo neural o uréter, y el sujeto mamífero puede ser un ser humano. La composición también puede contener células viables histocompatibles con el sujeto, por ejemplo, células obtenidas del sujeto mamífero. Estas células pueden ser, por ejemplo, células epidérmicas, queratinocitos, fibroblastos de células endoteliales, células madre embrionarias de origen embrionario no humano, células madre mesenquimales adultas o embrionarias de origen embrionario no humano, células madre de cordón umbilical, procondroblastos, condroblastos, condrocitos, pro-osteoblastos, osteocitos, osteoclastos,

monocitos, pro-cardiomioblastos, pericitos, cardiomioblastos, cardiomiocitos, células epiteliales gingivales, o células madre del ligamento periodontal. El método puede implicar además la administración al sujeto de uno o más agentes, por ejemplo, un factor de crecimiento celular, un factor angiogénico, un factor de diferenciación, una citocina, una hormona y una quimiocina. Tales agentes pueden estar en la composición colocada en o sobre el órgano o tejido receptor o pueden inyectarse o infundirse en el sujeto mamífero por separado de la composición. Además, los agentes pueden administrarse administrando al sujeto uno o más vectores de expresión que contienen una o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican el o los agentes, estando cada una de las una o más secuencias de ácidos nucleicos unidas operativamente a un elemento regulador transcripcional o traduccional. Estos vectores de expresión pueden estar en una o más células que se administran al sujeto. La o las células pueden estar en la composición o pueden administrarse al sujeto por separado de la composición. La composición contiene además polvo de hueso desmineralizado. Cuando el tejido receptor es la encía, la encía es la encía retraída o está próxima a ella. Además, cuando el tejido receptor es la encía, la encía puede contener un alvéolo de extracción dental.

Como se usa en el presente documento, el término "el órgano o tejido receptor es diferente del órgano o tejido donado a base de colágeno" significa que el órgano o tejido receptor en o sobre el que se coloca una matriz acelular es diferente del órgano o tejido a base de colágeno a partir del cual se hizo la matriz acelular, independientemente de si el órgano o tejido a base de colágeno se obtuvo del individuo receptor o de uno o más individuos diferentes. Por lo tanto, por ejemplo, cuando una válvula cardíaca de un individuo huésped es el tejido receptor que va a injertarse con una matriz acelular, la matriz acelular está hecha de un tejido distinto del tejido valvular cardíaco, es decir, la matriz acelular no puede haber sido hecha de tejido de válvula cardíaca obtenido del individuo receptor o de uno o más individuos diferentes. De forma similar, cuando la piel de un individuo huésped es el tejido receptor que va a repararse con una matriz acelular, la matriz acelular está hecha de un tejido distinto del tejido cutáneo, es decir, la matriz acelular no puede haber sido hecha de tejido cutáneo (por ejemplo, dermis) obtenido del individuo receptor o de uno o más individuos diferentes. Este concepto se aplica tanto a las matrices acelulares particuladas como a las no particuladas.

Como se usa en el presente documento, el término "colocar" una composición incluye, sin limitación, establecer, inyectar, infundir, verter, empaquetar, estratificar, pulverizar, y revestir la composición. Además, colocar "sobre" un tejido u órgano receptor significa poner en una relación de contacto con el tejido u órgano receptor.

Como se usa en el presente documento, el término "unido operativamente" significa incorporado en una construcción genética de manera que las secuencias de control de la expresión (es decir, los elementos reguladores de la transcripción y la traducción) controlen eficazmente la expresión de una secuencia codificante de interés. Los elementos reguladores transcripcionales y traduccionales incluyen, pero sin limitación, promotores inducibles y no inducibles, potenciadores, operadores y otros elementos que se conocen por los expertos en la técnica y que dirigen o regulan de otro modo la expresión génica. Dichos elementos reguladores incluyen, pero sin limitación, el gen temprano inmediato de hCMV de citomegalovirus, los promotores temprano o tardío del adenovirus SV40, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC, el sistema TRC, el operador principal y las regiones promotoras del fago A, las regiones de control de la proteína de cubierta fd, el promotor para 3-fosfoglicerato cinasa, los promotores de fosfatasa ácida y los promotores de los factores de apareamiento  $\alpha$  de levadura.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. En caso de conflicto, prevalecerá el presente documento, incluidas las definiciones. Los procedimientos y materiales preferidos se describen a continuación, aunque se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o prueba de la presente invención.

Otras características y ventajas de la invención, por ejemplo, la reparación de múltiples órganos y tejidos con matrices acelulares hechas a partir de tejidos a base de colágeno, serán evidentes a partir de la siguiente descripción, de los dibujos y de las reivindicaciones.

## DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las figuras 1A-D son fotografías de hueso de cerdo y tejido de cartílago que incluyen cóndilos laterales o mediales en los que se formaron defectos que se extienden a través del cartílago y 5 mm en el hueso subcondral. No se colocó ningún implante en un defecto de control (figura 1B). Los otros defectos se rellenaron con: una masilla hecha con una alta concentración (aproximadamente 600 mg/ml) de Cymetra® y sellada en la superficie con cola de fibrina (figura 1D); un gel hecho con una concentración más baja (aproximadamente 330 mg/ml) de Cymetra en combinación con fibrinógeno y trombina y sellado en la superficie con cola de fibrina (figura 1C); y una pasta hecha con una concentración más baja (aproximadamente 330 mg/ml) de Cymetra mantenida en su lugar por una lámina de AlloDerm® suturada al perímetro del defecto del cartílago (figura 1A). Las fotografías se tomaron 8 semanas después de la cirugía.

La figura 2 es un par de radiografías que muestran un defecto de hueso crítico en un fémur de cerdo que se había

envuelto con una lámina de Xenoderm™ y se había llenado con una mezcla 1:1 de gránulos de sulfato cálcico y hueso de autoinjerto esponjoso. Las radiografías se tomaron 6 semanas después de la cirugía.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

5 Los experimentos descritos en los ejemplos indican que la implantación de una matriz acelular hecha de un tejido u órgano a base de colágeno en, o en contacto directo con, un tejido u órgano dañado o defectuoso distinto de aquel a partir del cual se formó la matriz acelular puede facilitar la reparación del tejido u órgano dañado o defectuoso. Como se usa en el presente documento, una "matriz acelular" es una matriz que: (a) está hecha de cualquiera de una amplia gama de tejido a base de colágeno; (b) es acelular; y (c) conserva las funciones biológicas y estructurales poseídas por el tejido u órgano nativo del que se hizo. Las funciones biológicas conservadas por las matrices incluyen el reconocimiento celular y la unión celular, así como la capacidad de soportar la propagación celular, la proliferación celular y la diferenciación celular. Dichas funciones se proporcionan por proteínas colágenas no desnaturalizadas (por ejemplo, colágeno tipo I) y una diversidad de moléculas no colágenas (por ejemplo, proteínas que sirvan como ligandos para moléculas tales como receptores de integrinas, moléculas con alta densidad de carga tales como glucosaminoglicanos (por ejemplo, hialuronano) o proteoglicanos, u otras adhesinas). Las funciones estructurales conservadas por las matrices acelulares útiles incluyen el mantenimiento de la arquitectura histológica, el mantenimiento del conjunto tridimensional de los componentes del tejido y las características físicas tales como resistencia, elasticidad, y durabilidad, porosidad definida y retención de macromoléculas. La eficacia de las funciones biológicas de una matriz acelular puede medirse, por ejemplo, por su capacidad para soportar la proliferación celular y es al menos del 50 % (por ejemplo, al menos: 50 %; 60 %; 70 %; 80 %; 90 %; 95 %; 98 %; 99 %; 99,5 %; 100 %; o más del 100 %) de la del tejido u órgano nativo del que está hecha la matriz acelular. Además, la integridad de la membrana basal en las matrices acelulares, medida por microscopía electrónica y/o inmunohistoquímica, es al menos el 70 % de la del tejido u órgano nativo del que está hecha la matriz acelular.

25 Por lo tanto, como se ha indicado anteriormente, no es necesario que el material de la matriz injertada esté hecho de tejido que sea idéntico al tejido huésped circundante, sino que simplemente debería ser susceptible de ser remodelado por células invasoras o infiltrantes tales como células diferenciadas del tejido huésped relevante, células madre, tales como células madre mesenquimales o células progenitoras. La remodelación está dirigida por los componentes de la matriz acelular y las señales que se han descrito anteriormente del tejido huésped circundante (tales como citocinas, componentes de la matriz extracelular, estímulos biomecánicos, y estímulos bioeléctricos). La presencia de células madre mesenquimales en la médula ósea y la circulación periférica se ha documentado en la bibliografía y se ha demostrado que regenera una diversidad de tejidos musculoesqueléticos [Caplan (1991) J. Orthop. Res. 9:641-650; Caplan (1994) Clin. Plast. Surg. 21:429-435; y Caplan et al. (1997) Clin Orthop. 342:254-269]. Además, el injerto debe proporcionar cierto grado (superior al valor umbral) de resistencia a la tracción y resistencia biomecánica durante el procedimiento de remodelación.

40 Se entiende que la matriz acelular puede producirse a partir de cualquier tejido a base de colágeno (por ejemplo, dermis, fascia, cordones umbilicales, placentas, válvulas cardíacas, ligamentos, tendones, tejido vascular (arterias y venas tales como venas safenas), tejido conectivo neural, o uréteres), siempre que las propiedades descritas anteriormente sean conservadas por la matriz. Además, los tejidos en los que se colocan los aloinjertos anteriores incluyen esencialmente cualquier tejido que pueda remodelarse invadiendo o infiltrando células (véase más arriba). Los tejidos relevantes incluyen tejidos esqueléticos tales como hueso, cartílago, ligamentos, fascia y tendón. Otros tejidos en los que se puede colocar cualquiera de los aloinjertos anteriores incluyen, sin limitación, piel, encía, duramadre, miocardio, tejido vascular, tejido neural, músculo estriado, músculo liso, pared de la vejiga, tejido de uréter, intestino y tejido de uretra. Se entiende que, para los fines de la invención, el músculo cardíaco y el músculo esquelético no son el mismo tejido.

50 Además, aunque una matriz acelular generalmente se habrá fabricado a partir de uno o más individuos de la misma especie que el receptor del injerto de matriz acelular, este no es necesariamente el caso. Por lo tanto, por ejemplo, una matriz acelular puede haberse hecho a partir de un cerdo y se puede implantar en un paciente humano. Las especies que pueden servir como receptores de matrices acelulares y donantes de tejidos u órganos para la producción de las matrices acelulares incluyen, sin limitación, seres humanos, primates no humanos (por ejemplo, monos, mandriles o chimpancés), cerdos, vacas, caballos, cabras, ovejas, perros, gatos, conejos, cobayas, jerbos, hámsteres, ratas o ratones.

60 La forma en que se proporciona la matriz acelular dependerá del tejido u órgano del que se obtiene y de la naturaleza del tejido u órgano receptor, así como de la naturaleza del daño o defecto en el tejido u órgano receptor. Por lo tanto, por ejemplo, una matriz derivada de una válvula cardíaca puede proporcionarse como una válvula completa, como pequeñas láminas o tiras, como piezas cortadas en cualquiera de una diversidad de formas y/o tamaños, o en forma de partículas. El mismo concepto se aplica a las matrices acelulares producidas a partir de cualquiera de los tejidos y órganos enumerados anteriormente. Se entiende que una matriz acelular útil para la invención se puede fabricar a partir de un tejido a base de colágeno del propio receptor.

Las matrices acelulares se pueden producir mediante cualquiera de una diversidad de procedimientos. Todo lo que se requiere es que las etapas usadas en su producción den como resultado matrices con las propiedades biológicas y estructurales descritas anteriormente. Los procedimientos de producción particularmente útiles incluyen los descritos en las Patentes de Estados Unidos N.º 4.865.871 y 5.366.616 y las solicitudes de Estados Unidos con N.º de serie 09/762.174 y 10/165.790 en tramitación junto con la presente. La preparación de una matriz acelular particulada se describe en el documento WO99/65470 A1. Las composiciones de polvo de hueso desmineralizado y su uso en la reparación ósea se describen en el documento EP0419275 A1.

Brevemente, las etapas implicadas en la producción de una matriz generalmente incluyen recoger el tejido de un donante (por ejemplo, un cadáver humano o cualquiera de los mamíferos enumerados anteriormente), un tratamiento químico para estabilizar el tejido y evitar la degradación bioquímica y estructural, junto con o seguido de la eliminación celular en condiciones que, de manera similar, conserven la función biológica y estructural. Después de la eliminación completa de los componentes de células muertas y/o lisadas que pueden causar inflamación, así como cualquier agente de eliminación celular bioincompatible, la matriz está en principio lista para el injerto y solo necesita procesarse hasta lograr una forma o tamaño deseado. Como alternativa, la matriz puede tratarse con un agente de criopreservación y criopreservarse y, opcionalmente, liofilizarse, de nuevo bajo las condiciones necesarias para mantener las propiedades biológicas y estructurales descritas de la matriz. Después de la liofilización, el tejido se puede pulverizar o micronizar para producir una matriz acelular particulada en condiciones similares de conservación de la función. En general, todas las etapas se realizan en condiciones asépticas, preferiblemente estériles.

La solución estabilizante inicial detiene e impide la degradación osmótica, hipóxica, autolítica y proteolítica, protege frente a la contaminación microbiana, y reduce el daño mecánico que se puede producir con tejidos que contengan, por ejemplo, componentes del músculo liso (por ejemplo, vasos sanguíneos). La solución estabilizante contiene en general un tampón apropiado, uno o más antioxidantes, uno o más agentes oncóticos, uno o más antibióticos, uno o más inhibidores de proteasas y, en algunos casos, un relajante del músculo liso.

A continuación, el tejido se coloca en una solución de procesamiento para eliminar las células viables (por ejemplo, células epiteliales, células endoteliales, células del músculo liso y fibroblastos) de la matriz estructural sin dañar el complejo de la membrana basal o la integridad biológica y estructural de la matriz de colágeno. La solución de procesamiento contiene generalmente un tampón apropiado, sal, un antibiótico, uno o más detergentes, uno o más agentes para impedir la reticulación, uno o más inhibidores de proteasas y/o una o más enzimas. El tratamiento del tejido debe realizarse (a) con una solución de procesamiento que contenga agentes activos a una concentración y (b) durante un período de tiempo tales que se evite la degradación del complejo de membrana basal y se mantenga la integridad estructural de la matriz.

Después de que el tejido se descelulariza, preferiblemente se incuba en una solución de criopreservación. Esta solución generalmente contiene uno o más crioprotectores para minimizar el daño del cristal de hielo a la matriz estructural que podría ocurrir durante la congelación. Si el tejido va a liofilizarse, la solución generalmente también contendrá uno o más componentes de protección en seco para minimizar el daño estructural durante el secado, y puede incluir una combinación de un disolvente orgánico y agua que no experimenta expansión o contracción durante la congelación. Como un procedimiento alternativo, la matriz tisular descelularizada se puede fijar con un agente de reticulación, tal como glutaraldehído, y almacenarse antes del trasplante. Los agentes crioprotectores y de protección en seco pueden ser la misma sustancia o más. Si el tejido no va a liofilizarse, puede congelarse colocándolo (en un recipiente esterilizado) en un congelador a aproximadamente -80 °C, o sumergiéndolo en nitrógeno líquido estéril, y luego almacenándolo a una temperatura por debajo de -160 °C hasta su uso. La muestra puede descongelarse antes de su uso, por ejemplo, sumergiendo un recipiente estéril no permeable (véase a continuación) en un baño de agua a aproximadamente 37 °C, o permitiendo que el tejido llegue a temperatura ambiente en condiciones ambientales.

Si el tejido debe congelarse y liofilizarse, después de la incubación en la solución de criopreservación, el tejido se envasa dentro de un recipiente estéril que es permeable al vapor de agua, pero impermeable a las bacterias, por ejemplo, una bolsa permeable al vapor de agua o vial de vidrio. Un lado de una bolsa preferida consiste en una membrana Tyvek® porosa de calidad médica, un producto registrado de DuPont Company de Wilmington, DE. Esta membrana es porosa al vapor de agua e impermeable a las bacterias y al polvo. La membrana Tyvek está termosellada a una lámina laminada de polietileno impermeable, dejando un lado abierto, formando así una bolsa de dos lados. La bolsa abierta se esteriliza mediante irradiación (por ejemplo, irradiación gamma) antes de su uso. El tejido se coloca asépticamente (a través del lado abierto) en la bolsa estéril. El lado abierto se termosella entonces asépticamente para cerrar la bolsa. A partir de ese momento, el tejido empaquetado queda protegido de la contaminación microbiana a lo largo de las etapas de procesamiento posteriores.

El recipiente que contiene el tejido se enfría a baja temperatura a una velocidad especificada que es compatible con el crioprotector específico para minimizar el desarrollo de hielo hexagonal nocivo y para generar las formas de hielo menos estables de fases amorfas y cúbicas. Véase la Patente de Estados Unidos N.º 5.336.616 para ejemplos de

5 protocolos de enfriamiento apropiados. El tejido se seca después a baja temperatura en condiciones de vacío, de tal forma que el vapor de agua se elimina secuencialmente de cada fase de cristal de hielo sin recristalización en hielo. Dicho secado se logra mediante liofilización convencional o mediante el uso de un secador por destilación molecular previamente patentado. Los secadores por destilación molecular adecuados pueden obtenerse en LifeCell Corporation en Woodlands, TX y se describen en las Patentes de Estados Unidos N.º 4.567.847 y 4.799.361.

10 Al finalizar el secado de las muestras en el recipiente permeable al vapor de agua, el vacío del aparato de liofilización se invierte con un gas inerte seco tal como nitrógeno, helio o argón. Mientras se mantiene en el mismo entorno gaseoso, el recipiente semipermeable se coloca dentro de un recipiente (por ejemplo, una bolsa) impermeable (es decir, impermeable al vapor de agua, así como a los microorganismos), que se sella adicionalmente, por ejemplo, mediante calor y/o presión. Cuando la muestra de tejido se haya congelado y secado en un vial de vidrio, el vial se sella al vacío con un tapón inerte apropiado, y el vacío del aparato de secado se invierte con un gas inerte antes de la descarga. En cualquier caso, el producto final está sellado herméticamente en una atmósfera gaseosa inerte.

15 El tejido liofilizado se puede almacenar bajo estas condiciones durante períodos de tiempo prolongados en condiciones de refrigeración ambiental. El transporte puede realizarse a través de transportadores estándar y en condiciones estándar relativas a la exposición a la temperatura normal y los tiempos de entrega.

20 Generalmente (pero no necesariamente), el tejido seco se rehidrata antes del trasplante. Es importante minimizar las fuerzas osmóticas y los efectos de la tensión superficial durante la rehidratación. El objetivo de la rehidratación es aumentar la conservación selectiva de la matriz de soporte extracelular. La rehidratación apropiada se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante una incubación inicial del tejido seco en un entorno de aproximadamente el 100 % de humedad relativa, seguido de la inmersión en una solución de rehidratación adecuada. Como alternativa, el tejido seco puede sumergirse directamente en la solución de rehidratación sin incubación previa, en un entorno de alta humedad. La rehidratación no debe causar daño osmótico a la muestra. La rehidratación con vapor debería, idealmente, lograr un nivel de humedad residual de al menos el 15 % y la rehidratación con fluidos debería dar como resultado un nivel de humedad del tejido de entre el 20 % y el 70 %. En función del tejido a rehidratar, la solución de rehidratación puede ser, por ejemplo, solución salina normal, lactato de Ringer, o un medio de cultivo celular estándar. Cuando el tejido está sujeto a la acción de colagenasas endógenas, elastasas o actividad autolítica residual de células previamente eliminadas, se preparan aditivos a la solución de rehidratación e incluyen inhibidores de la proteasa. Cuando está presente la actividad residual de radicales libres, se usan agentes para proteger contra radicales libres, incluyendo antioxidantes y agentes enzimáticos que protegen contra el daño de los radicales libres. Los antibióticos también se pueden incluir para inhibir la contaminación bacteriana. Los agentes oncóticos en forma de proteoglicanos, dextrano y/o aminoácidos también se pueden incluir para prevenir el daño osmótico a la matriz durante la rehidratación. La rehidratación de una muestra seca es especialmente adecuada para este proceso, ya que permite una distribución rápida y uniforme de los componentes de la solución de rehidratación. Además, las soluciones de rehidratación pueden contener componentes específicos no utilizados previamente, por ejemplo, difosfonatos para inhibir la fosfatasa alcalina y prevenir la calcificación posterior. También se pueden incluir agentes en la solución de rehidratación para estimular la neovascularización y la infiltración de la célula huésped después del trasplante de la matriz extracelular rehidratada. Como alternativa, la rehidratación puede realizarse en una solución que contiene un agente de reticulación tal como glutaraldehído.

45 Las células viables histocompatibles pueden restaurarse en las matrices acelulares para producir un injerto aceptado permanentemente que puede ser remodelado por el huésped. Esto generalmente se hace justo antes de la colocación de la matriz acelular en un sujeto mamífero. Cuando la matriz se ha liofilizado, se realizará después de la rehidratación. En una realización preferida, las células viables e histocompatibles se pueden añadir a las matrices mediante técnicas estándar de cocultivo celular *in vitro* antes de su trasplante, o mediante repoblación *in vivo* después de su trasplante.

50 Los tipos de células usadas para la reconstitución dependerán de la naturaleza del tejido u órgano para el que se está remodelando la matriz acelular. Por ejemplo, el requisito principal para la reconstitución de la piel de espesor total con una matriz acelular es la restauración de las células epidérmicas o los queratinocitos. Las células pueden derivarse del paciente receptor deseado, en forma de un pequeño injerto de piel dividida mallada o como queratinocitos aislados expandidos en láminas en condiciones de cultivo celular o como células madre de queratinocitos aplicadas a la matriz acelular. Como alternativa, pueden usarse queratinocitos alogénicos derivados del prepucio o de origen fetal para cultivar y reconstituir la epidermis.

60 La célula más importante para la reconstitución de válvulas cardíacas y conductos vasculares es la célula endotelial, que recubre la superficie interna del tejido. Las células endoteliales también se pueden expandir en cultivo y se pueden derivar directamente del paciente receptor deseado o de arterias o venas umbilicales.

Otras células con las que pueden repoblarse las matrices incluyen, pero sin limitación, fibroblastos, células madre embrionarias (ESC) de origen embrionario no humano, células madre mesenquimales adultas o embrionarias (MSC)

de origen no humano, procondroblastos, condroblastos, condrocitos, proosteoblastos, osteocitos, osteoclastos, monocitos, procariomioblastos, pericitos, cardiomioblastos, cardiomiocitos, células epiteliales gingivales, o células madre del ligamento periodontal. Naturalmente, las matrices acelulares pueden repoblarse con combinaciones de dos o más de estos tipos de células (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez).

5 Después de la eliminación de las células, después de la congelación, después del secado, después del secado y de la rehidratación, o después de la reconstitución de la matriz acelular (esté o no congelada o seca) con células apropiadas, la matriz acelular puede transportarse al hospital o centro de tratamiento apropiados. La elección de la composición final del producto dependerá de la aplicación clínica específica prevista.

10 Los reactivos y los procedimientos para realizar todas las etapas anteriores se conocen en la técnica. Los reactivos y procedimientos adecuados se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N.º 5.336.616.

15 Las matrices acelulares particuladas pueden fabricarse a partir de cualquiera de las matrices acelulares no particuladas descritas anteriormente mediante cualquier proceso que dé como resultado la conservación de las funciones biológicas y estructurales descritas anteriormente y, en particular, el daño a las fibras de colágeno, incluyendo los extremos de fibras cizalladas, debe minimizarse. Muchos procesos conocidos de humectación y secado para fabricar las matrices particuladas no conservan la integridad estructural de las fibras de colágeno.

20 Se describe un procedimiento apropiado en la Solicitud de Patente de Estados Unidos con N.º de Serie 09/762.174. El proceso se describe brevemente a continuación con respecto a una matriz acelular dérmica liofilizada, pero un experto en la técnica podría adaptar fácilmente el procedimiento para su uso con matrices acelulares liofilizadas derivadas de cualquiera de los otros tejidos enumerados en el presente documento.

25 La matriz dérmica acelular se puede cortar en tiras (usando, por ejemplo, un mallador Zimmer equipado con una rueda de corte "continua" sin interrupción). Las tiras largas resultantes se cortan entonces en longitudes de aproximadamente 1 cm a aproximadamente 2 cm. Un homogeneizador y una sonda homogeneizadora esterilizada (por ejemplo, un homogeneizador LabTeck Macro disponible en OMNI International, Warrenton, VA) se ensamblan y se enfrían a temperaturas criogénicas (es decir, desde aproximadamente -196 °C a aproximadamente -160 °C)

30 usando nitrógeno líquido estéril que se vierte en la torre del homogeneizador. Una vez que el homogeneizador ha alcanzado una temperatura criogénica, se añaden trozos cortados de matriz acelular a la torre de homogeneización que contiene el nitrógeno líquido. El homogeneizador se activa entonces para fracturar criogénicamente los trozos de matriz acelular. El tiempo y la duración de la etapa de fracturación criogénica dependerán del homogeneizador utilizado, el tamaño de la cámara de homogeneización, y la velocidad y el tiempo de funcionamiento del

35 homogeneizador, y pueden determinarse fácilmente por un experto en la técnica. Como alternativa, el proceso de criofracturación puede realizarse en un *cryomill* enfriado a una temperatura criogénica.

La matriz de tejido acelular particulada criofracturada se clasifica, opcionalmente, por tamaño de partícula lavando el producto de la homogeneización con nitrógeno líquido estéril a través de una serie de cribas de metal que también se han enfriado a una temperatura criogénica. En general, es útil eliminar partículas grandes no deseadas con una criba con un tamaño de poro relativamente grande antes de proceder con una (o más cribas) con un tamaño de poro más pequeño. Una vez aisladas, las partículas se pueden liofilizar para asegurar que se elimine toda la humedad residual que pueda haber sido absorbida durante el procedimiento. El producto final es un polvo (usualmente de color blanco o blanquecino), que generalmente tiene un tamaño de partícula de aproximadamente 1 micrómetro a

40 aproximadamente 900 micrómetros, de aproximadamente 30 micrómetros a aproximadamente 750 micrómetros, o de aproximadamente 150 a aproximadamente 300 micrómetros. El material se rehidrata fácilmente mediante suspensión en solución salina normal o cualquier otro agente rehidratante adecuado conocido en la técnica. También puede suspenderse en cualquier vehículo adecuado conocido en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 5.284.655).

50 Si se suspenden a una concentración alta (por ejemplo, a aproximadamente 600 mg/ml), las matrices acelulares particuladas pueden formar una "masilla", y si se suspenden a una concentración algo menor (por ejemplo, aproximadamente 330 mg/ml), pueden formar una "pasta". Dichas masillas y pastas pueden cargarse convenientemente en, por ejemplo, orificios, huecos, o espacios de cualquier forma en tejidos y órganos para llenar

55 sustancialmente dichos orificios, huecos o espacios.

LifeCell Corporation (Branchburg, NJ) produce una matriz acelular liofilizada muy adecuada a partir de dermis humana, que se comercializa en forma de pequeñas láminas como AlloDerm®. Dichas láminas son comercializadas por LifeCell Corporation como láminas rectangulares con las dimensiones de, por ejemplo, 1 cm x 2 cm, 3 cm x

60 7 cm, 4 cm x 8 cm y 5 cm x 10 cm. El crioprotector utilizado para congelar y secar AlloDerm es una solución de maltodextrina al 35 % y etilendiaminotetraacetato 10 mM (EDTA). De este modo, el producto seco final contiene aproximadamente el 60 % en peso de matriz acelular y aproximadamente el 40% en peso de maltodextrina. LifeCell Corporation también fabrica un producto análogo hecho de dermis de cerdo, que se comercializa como XenoDerm™ y tiene las mismas proporciones de matriz acelular y maltodextrina que AlloDerm. Además, LifeCell Corporation

comercializa una matriz dérmica acelular particulada fabricada por criofracturación de AlloDerm® (como se ha descrito anteriormente) con el nombre de Cymetra®. El tamaño de partícula para Cymetra está en el intervalo de aproximadamente 60 micrómetros a aproximadamente 150 micrómetros, según lo determinado por la masa.

5 La forma de la matriz acelular usada en cualquier caso particular dependerá del tejido u órgano al que se va a aplicar. Generalmente, las matrices acelulares no particuladas que se proporcionan en forma seca (por ejemplo, AlloDerm) se rehidratan en una solución fisiológica estéril (por ejemplo, solución salina) antes de su uso. Sin embargo, también se pueden usar secas.

10 Las láminas de matriz acelular (opcionalmente cortadas a un tamaño apropiado) pueden ser: (a) envueltas alrededor de un tejido u órgano que está dañado o que contiene un defecto; (b) situadas sobre la superficie de un tejido u órgano que está dañado o tiene un defecto; o (c) enrolladas e insertadas en una cavidad, hueco, o espacio en el tejido u órgano. Dichas cavidades, huecos o espacios pueden ser, por ejemplo: (i) de origen traumático, (ii) debido a la extirpación de tejido enfermo (por ejemplo, tejido miocárdico infartado), o (iii) debido a la extirpación de tumores malignos o no malignos. Las matrices acelulares pueden usarse para aumentar o mejorar tejidos u órganos subdesarrollados o para aumentar o reconfigurar tejidos u órganos deformados. Una o más de dichas tiras (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30 o más) se pueden usar en cualquier sitio particular. Los injertos se pueden mantener en su lugar mediante, por ejemplo, suturas, grapas, tachuelas o pegamentos o selladores tisulares conocidos en la técnica. Como alternativa, si, por ejemplo, se empaquetan con suficiente fuerza en un defecto o cavidad, es posible que no necesiten ningún dispositivo de seguridad. Las matrices acelulares particuladas pueden suspenderse en un vehículo estéril farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, solución salina normal) y pueden inyectarse a través de una aguja hipodérmica en un sitio de interés. Como alternativa, la matriz en polvo seco o una suspensión se pueden pulverizar en o sobre un sitio de interés. Una suspensión también se puede verter en o sobre un sitio particular. Además, mezclando la matriz acelular particulada con una cantidad relativamente pequeña de vehículo líquido, se puede hacer una "masilla". Tal masilla, o incluso una matriz acelular particulada seca, puede acoplarse, empaquetarse o encerrarse en cualquiera de los huecos, cavidades o espacios en los órganos o tejidos mencionados anteriormente. Además, se puede usar una matriz acelular no particulada en combinación con una matriz acelular particulada. Por ejemplo, una cavidad en el hueso puede cargarse con una masilla (como se ha descrito anteriormente) y cubrirse con una lámina de matriz acelular.

Se entiende que una matriz acelular se puede aplicar a un tejido u órgano con el fin de reparar o regenerar ese tejido u órgano y/o un tejido u órgano vecino. Por lo tanto, por ejemplo, una tira de matriz acelular puede envolverse alrededor de un defecto de hueso crítico de un hueso largo para generar un equivalente de periostio que rodea el defecto de hueso y el equivalente de periostio puede a su vez estimular la producción de hueso dentro del hueco en el hueso. De manera similar, al implantar una matriz acelular en un alveolo de extracción dental, el tejido de la encía dañado puede repararse y/o reemplazarse y el "nuevo" tejido de la encía puede ayudar a reparar y/o regenerar cualquier hueso en la base del alveolo que pueda haberse perdido como resultado, por ejemplo, de la extracción de dientes. Con respecto al tejido de las encías (gingiva), las encías retraídas también pueden reemplazarse por la inyección de una suspensión, o mediante el empaquetamiento de una masilla de matriz acelular particulada en el tejido de la encía apropiado. De nuevo, además de reparar el tejido gingival, este tratamiento puede dar como resultado la regeneración del hueso perdido como resultado de una enfermedad periodontal y/o la extracción de dientes. Las composiciones usadas para tratar cualquiera de los defectos gingivales anteriores pueden contener uno o más componentes diferentes enumerados en el presente documento, por ejemplo, polvo de hueso desmineralizado, factores de crecimiento, o células madre.

Tanto las matrices acelulares no particuladas como las particuladas se pueden usar junto con otros componentes de andamiaje o de soporte físico. Por ejemplo, una o más láminas de matriz acelular pueden estar dispuestas en capas con una o más láminas hechas de un material biológico distinto de la matriz acelular, por ejemplo, cartílago irradiado suministrado por un banco de tejidos tal como LifeNet, Virginia Beach, VA, o cuñas óseas y formas suministradas por, por ejemplo, Osteotech Corporation, Edentown, NJ. Como alternativa, dichas láminas distintas de matriz acelular pueden estar fabricadas con materiales sintéticos, por ejemplo, ácido poliglicólico o hidrogeles tal como los suministrados por Biocure, Inc., Atlanta, GA. Se describen otros materiales de andamiaje o soporte físico adecuados en la patente de Estados Unidos N.º 5.885.829. Se entiende que dichos componentes de andamiaje o soporte físico adicionales pueden tener cualquier tamaño o forma conveniente, por ejemplo, láminas, cubos, rectángulos, discos, esferas o partículas (como se ha descrito anteriormente para matrices acelulares particuladas).

Otras sustancias activas que pueden mezclarse con matrices acelulares particuladas o impregnarse en matrices acelulares no particuladas incluyen polvo de hueso, polvo de hueso desmineralizado, y cualquiera de los divulgados anteriormente.

Los factores que pueden incorporarse en las matrices, administrarse al sitio de colocación de un injerto de matriz acelular o administrarse sistémicamente incluyen cualquiera de una amplia gama de factores de crecimiento celular, factores angiogénicos, factores de diferenciación, citocinas, hormonas y quimiocinas conocidas en la técnica.

Cualquier combinación de dos o más de los factores se puede administrar a un sujeto por cualquiera de los medios enumerados a continuación. Los ejemplos de factores relevantes incluyen factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) (por ejemplo, FGF1-10), factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de queratinocitos, factores de crecimiento de células endoteliales vasculares (VEGF) (por ejemplo, VEGF A, B, C, D y E), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), interferones (IFN) (por ejemplo, IFN- $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$ ), factores de crecimiento transformantes (TGF) (por ejemplo, TGF $\alpha$  o  $\beta$ ), factor  $\alpha$  de necrosis tumoral, una interleucina (IL) (por ejemplo, IL-1 - IL-18), Osterix, Hedgehogs (por ejemplo, sonic o desert), SOX9, proteínas morfogénicas óseas, hormona paratiroidea, calcitonina, prostaglandinas o ácido ascórbico.

Los factores que son proteínas también pueden administrarse a un sujeto receptor administrando al sujeto: (a) vectores de expresión (por ejemplo, plásmidos o vectores virales) que contienen secuencias de ácido nucleico que codifican uno cualquiera o más de los factores anteriores que son proteínas; o (b) células que han sido transfectadas o transducidas (de forma estable o transitoria) con dichos vectores de expresión. Dichas células transfectadas o transducidas se obtendrán preferiblemente de, o serán histocompatibles con, el receptor. Sin embargo, es posible que solo se requiera una breve exposición al factor y, por lo tanto, también se pueden usar células histoincompatibles. Las células pueden incorporarse en las matrices acelulares (particuladas o no particuladas) antes de que las matrices se coloquen en el sujeto. Como alternativa, se pueden inyectar en una matriz acelular que ya esté colocada en un sujeto, en una región cercana a una matriz acelular que ya está colocada en un sujeto, o sistémicamente. Naturalmente, la administración de las matrices acelulares y/o cualquiera de las otras sustancias o factores mencionados anteriormente puede ser única o múltiple (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 80, 90, 100, o tantas como sea necesario). Cuando son múltiples, las administraciones pueden tener intervalos de tiempo fácilmente determinables por un experto en la técnica. Las dosis de las diversas sustancias y factores variarán enormemente de acuerdo con la especie, edad, peso, tamaño y sexo del sujeto, y también pueden determinarse fácilmente por un experto en la técnica.

Las afecciones para las que pueden usarse las matrices son múltiples. Por lo tanto, por ejemplo, pueden usarse para la reparación de huesos y/o cartílago con cualquiera de los daños o defectos descritos anteriormente. Se pueden usar matrices acelulares tanto particuladas como no particuladas en cualquiera de las formas y mediante cualquiera de los procesos enumerados anteriormente. Los huesos a los que se puede aplicar tal composición para su uso en el tratamiento incluyen, sin limitación, huesos largos (por ejemplo, tibia, fémur, húmero, radio, cúbito o peroné), huesos de la mano y el pie (por ejemplo, calcáneo o escafoides), huesos de la cabeza y el cuello (por ejemplo, hueso temporal, hueso parietal, hueso frontal, maxilar superior, mandíbula), o vértebras. Como se ha mencionado anteriormente, los defectos de hueso críticos del hueso se pueden tratar con matrices acelulares. En dichos defectos de hueso críticos, los huecos se pueden llenar con, por ejemplo, una masilla de matriz acelular particulada o láminas empaquetadas de matriz acelular y envolverse con láminas de matriz acelular. Como alternativa, los huecos pueden envolverse con una lámina de matriz acelular y llenarse con otros materiales (véase a continuación). En todos estos tratamientos de huesos y/o cartílagos, se pueden usar materiales adicionales para ayudar aún más en el proceso de reparación. Por ejemplo, el hueso puede llenarse con hueso esponjoso y/o gránulos de sulfato de calcio y pueden administrarse matrices acelulares particuladas a sitios de daño óseo o defectos óseos mezcladas con polvo de hueso desmineralizado. Además, las matrices acelulares se pueden combinar con médula ósea y/o astillas de hueso del receptor.

Las matrices acelulares también se pueden usar para reparar la fascia, por ejemplo, la fascia de la pared abdominal o la fascia del suelo pélvico. En dichos procedimientos, las tiras de matriz acelular generalmente están unidas al suelo abdominal o pélvico, por ejemplo, por sutura a la fascia circundante o al tejido huésped o a ligamentos o tendones estables tal como el ligamento de Cooper.

El miocardio infartado es otro candidato para la reparación de remodelación por matrices acelulares. Contrariamente al dogma anterior, ahora se sabe que no todos los miocitos cardíacos han perdido potencial proliferativo y, por lo tanto, regenerativo [por ejemplo, Beltrami et al. (2001) *New. Engl. J. Med.* 344:1750-1757; Kajstura et al. (1998) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 95:8801-8805]. Además, las células madre, presentes por ejemplo en la médula ósea y la sangre y como pericitos asociados con los vasos sanguíneos, pueden diferenciarse a miocitos cardíacos. O bien el propio tejido infartado se puede eliminar y reemplazar con una lámina de matriz acelular cortada a un tamaño apropiado o se puede inyectar una suspensión de matriz acelular particulada en el tejido infartado. La hipoplasia cardíaca congénita, u otros defectos estructurales, pueden repararse, por ejemplo, realizando una incisión en el tejido, expandiendo el hueco creado por la incisión, e insertando una lámina de matriz acelular cortada al tamaño deseado, o colocando láminas de matriz acelular en las superficies epicárdica y endocárdica y colocando matriz acelular particulada entre ellas. Se entiende que, en ciertas condiciones, crear un hueco por incisión puede no ser suficiente y puede ser necesario extirpar parte del tejido. Naturalmente, un experto en la técnica apreciará que las matrices acelulares pueden utilizarse de manera similar para reparar daños o defectos en otros tipos de músculos, por ejemplo, uréter o músculo esquelético tal como bíceps, pectoral o dorsal ancho.

Además, las láminas de matriz acelular pueden usarse para reparar o reemplazar tejido intestinal dañado o eliminado, incluyendo el esófago, el estómago y el intestino delgado y grueso. En este caso, las láminas de matriz

5 acelular se pueden utilizar para reparar perforaciones u orificios en el intestino. Como alternativa, se puede formar una lámina de matriz acelular, por ejemplo, en un cilindro que se puede usar para llenar un hueco en el intestino (por ejemplo, un hueco creado por cirugía para extirpar un tumor o un segmento enfermo del intestino). Dichos procedimientos se pueden usar para tratar, por ejemplo, hernias diafragmáticas. Se entenderá que también se puede usar una matriz acelular en forma de lámina para reparar el propio diafragma en esta condición, así como en otras condiciones del diafragma que requieren reparación o reemplazo, o la adición de tejido.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención.

10 **EJEMPLOS**

Ejemplo 1. Remodelación de una matriz dérmica acelular en hueso y cartílago evaluada siete días después de la creación de defectos osteocondrales de espesor completo

15 En este primer ejemplo, se examinaron los procesos reparativos en un momento temprano después del implante (1 semana) para demostrar los eventos de remodelación temprana, incluida la repoblación, la revascularización y la integración. Además, se probaron diferentes configuraciones de materiales de matriz acelular. Se usó un modelo de minicerdo de Yucatán para evaluar la eficacia de Xenoderm (lámina de matriz dérmica porcina acelular) y Xenoderm  
20 particulado micronizado (matriz dérmica porcina acelular criofracturada) para reparar el cartílago articular y los defectos óseos. La cría de animales y la cirugía se realizaron de acuerdo con los requisitos del Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC). En general, los animales se anestesiaron con Telazol (8 mg/kg), Ketamina (4 mg/kg) y Xilazina (4 mg/kg), por vía intramuscular (IM). Se entubaron y se mantuvieron con isoflurano al 2-3 % y 1-2 l de O<sub>2</sub>/minuto. Los medicamentos preoperatorios incluyeron aproximadamente 40 mg/kg de Cefazolina por vía intravenosa (IV), 0,007 mg/kg de Buprenorfina IM, y 0,01 mg/kg de Glicopirrolato IM. El agente antimicrobiano  
25 postoperatorio fue de 3,0 a 3,5 g de Cefazolina IV. La analgesia postoperatoria incluyó 0,007 mg/kg de Buprenorfina IM y 50 y 75 µg/hora de parches de Fentanilo (transdérmico) colocados cada 1-3 días según fuese necesario.

*Animal 1 (ID# 80-6). Modelo de reparación de cartílago.*

30 Solamente se operó la pata posterior derecha del animal, ya que existía la preocupación de que la exposición y la cirugía en la articulación de la región rotular (articulación de la rodilla) de ambas patas daría como resultado una cojera excesiva y el consiguiente dolor y sufrimiento.

35 Se realizó una incisión lateral que se extendía desde el fémur distal a la tibia proximal, exponiendo la cápsula articular. Se realizó una incisión en el espacio articular para exponer los cóndilos laterales y medial. Se usó una broca de 6 mm con una manga para evitar la perforación excesiva de la profundidad del defecto para crear el defecto final. Se usó solución salina estéril para hidratar las matrices de ensayo antes de la implantación. Después de irrigar el defecto con una solución salina para eliminar los restos óseos y los elementos de médula derramados, se empaquetó el compuesto de matriz apropiado en el sitio del defecto. El espacio de la articulación se lavó  
40 abundantemente con solución salina y se cerró con 3-0 PDS (sutura de polidioxanosulfato, Ethicon Inc, Sommerville NJ) con un patrón de sutura discontinua. Las capas muscular y subcutánea se cerraron con 2-0 Prolene (sutura de polipropileno, Ethicon Inc., Sommerville NJ) con un patrón de sutura continua.

45 Se creó en el cóndilo lateral un defecto de espesor completo de 6 mm de diámetro y que se extendía 6-8 mm en el hueso subcondral. El defecto se rellenó con XenoDerm micronizado (equivalente porcino de Cymetra) resuspendido a aproximadamente 330 mg/ml en solución salina estéril. Se cortó según el tamaño una lámina (2 cm<sup>2</sup>) de XenoDerm (equivalente porcino de AlloDerm), se colocó sobre el defecto y se fijó en su lugar mediante el uso de tachuelas bioabsorbibles de Poli L-Lactida (PLLA) (AutoTac System, BioHorizons, Birmingham AL) en puntos de apoyo sin levantamiento de peso del cóndilo. Después del posicionamiento de la lámina de XenoDerm, el relleno del defecto se aseguró mediante la inyección de una suspensión de Xenoderm micronizada adicional a través de la  
50 lámina utilizando una aguja de calibre 26.

55 Se creó en el cóndilo medial un defecto idéntico (6 mm de diámetro y 6-8 mm de penetración del hueso subcondral). El defecto se rellenó con una tira de XenoDerm de 6 mm de ancho en una configuración de "rollo de cigarro". Después de la implantación de la tira en "rollo de cigarro", el espacio que quedaba por encima del implante se llenó con tres discos circulares de 6 mm de lámina de XenoDerm instalados a presión en el defecto. Se cortó según el tamaño una lámina (2 cm<sup>2</sup>) de XenoDerm, se colocó sobre el cóndilo y se fijó en su lugar con siete puntos de sutura equidistantes utilizando 6-0 PDS.

60 *Animal 2 (ID# 80-2). Modelo de injerto óseo*

Ambas patas traseras fueron operadas, ya que se consideró que la cirugía sería menos traumática en comparación con el acceso al espacio articular. Se usó un abordaje lateral de la articulación de la región rotular (articulación de la rodilla) con una incisión cutánea que se extendía desde la cara distal del fémur hasta la tuberosidad tibial. El tejido

subcutáneo se diseccionó y se usó un elevador perióstico para despejar las uniones fasciales al fémur distal y a la tibia proximal.

5 Se crearon defectos de 1 cm de diámetro, que penetraban 4-5 mm en el hueso en las caras laterales del fémur distal y de la tibia proximal de ambas patas traseras, usando una broca de 1 cm de diámetro.

10 El defecto en el fémur distal de la pata derecha se rellenó con láminas XenoDerm precortadas de 1 cm de diámetro. Se suturó una lámina de 2 cm<sup>2</sup> de XenoDerm usando 6-0 Prolene al periostio circundante que cubría el implante. El defecto en la tibia proximal de la pata derecha se llenó con XenoDerm micronizado, rehidratado en solución salina estéril a aproximadamente 330 mg/ml. El implante se mantuvo en su lugar por la aposición cercana de la fascia y el músculo suprayacentes al cierre de la herida.

15 El defecto en el fémur distal de la pata izquierda se rellenó con XenoDerm micronizado seco. Se colocó una lámina de 2 cm<sup>2</sup> de XenoDerm sobre el defecto y se fijó en su lugar mediante 4 tachuelas PLLA (AutoTac, Biohorizons, Birmingham AL). El defecto en la tibia proximal de la pata izquierda se rellenó con hueso autólogo que se obtuvo al agrupar el hueso recogido durante la creación de los cuatro defectos óseos. El hueso autólogo se mantuvo húmedo con solución salina estéril y se morselizó con un mortero antes de la implantación. El implante se mantuvo en su lugar por la aposición cercana de la fascia y el músculo suprayacentes al cierre de la herida.

20 Los animales se colocaron en un cabestrillo durante al menos 2 horas después de la cirugía. Después de la recuperación de la anestesia, los animales se mantuvieron en corrales restringidos que permitían un movimiento y soporte de peso restringidos. Veinticuatro horas después de la cirugía, ambos animales eran móviles. El animal 1 (defecto del cartílago) favorecía la pata quirúrgica, pero limitaba la carga de peso en la extremidad operada. El animal 2 (defectos óseos) era móvil.

25 Siete días después de la cirugía, los animales se sacrificaron y las extremidades posteriores de ambos animales se desarticulaban en la articulación de la cadera y las extremidades del implante óseo del animal 2 se tomaron para realizar una radiografía. Las regiones articulares se diseccionaron de las extremidades y se sometieron a un examen macroscópico y microscópico.

30 Con respecto al animal 1 (#80-6), se hicieron las siguientes observaciones macroscópicas.

(a) Cóndilo femoral lateral

35 En el defecto relleno de XenoDerm micronizado, la lámina de XenoDerm se había liberado, pero se mantuvo en su lugar en un punto de adhesión. La hemorragia fue evidente en la articulación en la interfaz entre los cóndilos y la superficie de articulación rotuliana. El defecto era ligeramente cóncavo (1-1,5 mm por debajo de la superficie), rojizo y de apariencia sanguinolenta. Los orificios de las tachuelas eran claramente visibles y de color negro. El bloque de cartílago-hueso se extirpó y se colocó en un fijador de formalina al 10 % durante 4 días a 4 °C. La lámina de XenoDerm se fijó por separado en formalina al 10 % en las mismas condiciones.

(b) Cóndilo femoral medial

45 El colgajo de XenoDerm estaba intacto y bien fijado a la superficie del cartílago. Las suturas se cortaron y el colgajo se colocó en formalina al 10 %, como se describió anteriormente. El hilo de sutura era adherente al defecto. El defecto era continuo con la superficie del cartílago y firme al tacto y había algo de sangre. La superficie total del cartílago se veía clara. El bloque de cartílago-hueso se extirpó y se fijó en formalina al 10 % como se ha descrito anteriormente.

50 Ambos bloques se retiraron de la formalina después de 4 días, y se dividieron en dos con una cuchilla de afeitar con un espesor de 3-4 mm para el procesamiento en un disolvente de "descalcificación".

55 En resumen, las observaciones macroscópicas dejaron claro que 1 semana después de la implantación los materiales del implante estaban presentes en los defectos osteocondrales, que había continuidad con el tejido circundante y que había retención de volumen.

Con respecto al animal 2 (#80-2), se hicieron las siguientes observaciones macroscópicas.

Análisis macroscópico

60 (a) Pata derecha, fémur distal

La lámina de XenoDerm que cubría el defecto estaba en su lugar, aunque era evidente un hematoma significativo alrededor del sitio quirúrgico. Hubo una ligera depresión en el centro del colgajo (alrededor de 1 mm). Todo el

implante y el hueso circundante se extirparon con una sierra para huesos y el bloque se colocó en formalina al 10 %. Después de 4 días en formalina, el bloque se dividió y se observó la apariencia macroscópica del implante.

(b) Pata derecha, tibia proximal

Los márgenes del defecto no se distinguieron fácilmente, y fue evidente un hematoma significativo. La superficie del implante era irregular, pero firme a la penetración con una sonda. Todo el implante y el hueso circundante se extirparon con una sierra para huesos y el bloque se colocó en formalina al 10 %. Después de 4 días en formalina, el bloque se dividió y se observó la apariencia macroscópica del implante.

(c) Pata izquierda, fémur distal

La lámina de XenDerm fijada con tachuelas PLLA estaba intacta y normal, y parecía ser adherente al periostio circundante. El material del implante subyacente a la lámina era firme al sondaje. Todo el implante y el hueso circundante se extirparon con una sierra para huesos y el bloque se colocó en formalina al 10 %. Después de 4 días en formalina, el bloque se dividió y se observó la apariencia macroscópica del implante.

(d) Pata izquierda, tibia proximal

El implante de hueso autólogo mostró una superficie rugosa con fragmentos óseos protuberantes. El implante era resistente al sondaje. Todo el implante y el hueso circundante se extirparon con una sierra para huesos y el bloque se colocó en formalina al 10%. Después de 4 días en formalina, el bloque se dividió y se observó la apariencia macroscópica del implante.

A nivel macroscópico, todos los implantes óseos presentaron retención de volumen y buen contacto con el tejido circundante. No hubo evidencia de infección o rechazo detectable del implante.

#### Análisis Histológico

La reparación y regeneración tisular eficaz requiere que el material de implante se revascularice. La revascularización facilita la repoblación mediante células reparadoras que impulsan el proceso de remodelación. El análisis histológico del defecto osteocondral creado en el animal 1, relleno de XenDerm micronizado, es representativo de estos procesos que se producen en todas las configuraciones de implantes acelulares. La tinción con hematoxilina y eosina (H&E) del defecto osteocondral 7 días después del implante indicó que las dimensiones aproximadas del defecto original están claramente definidas, con un orificio de 6 mm de diámetro que penetra bien en el hueso subcondral subyacente. También se identificaron el cartílago articular del huésped circundante, y los elementos del hueso trabecular subyacente y de la médula ósea. Hubo evidencia, incluso en este punto de tiempo temprano, de crecimiento de cartílago en la superficie y nueva formación de hueso a lo largo de ambas paredes y la base del defecto. Se observó una integración eficaz entre el implante y el cartílago huésped circundante, la revascularización extensa como se evidencia por numerosos vasos sanguíneos por todo el implante, y las extensiones trabeculares, representativas de la formación de hueso nuevo, que surgen de la base del implante. Estos fenómenos se observaron en todo el material de implante acelular en diversos grados, según la configuración del implante. El XenDerm micronizado mostró un mayor grado de revascularización y repoblación celular en comparación con la lámina de XenDerm en este punto de tiempo temprano. Sin embargo, la conclusión general fue que, a los 7 días, se producían los eventos de remodelación apropiados que facilitarían la reparación del cartílago y el hueso.

#### Ejemplo 2. Remodelación de una matriz dérmica acelular en hueso y cartílago evaluada ocho semanas después de la creación de defectos osteocondrales de espesor completo

Se realizó un estudio usando el modelo de defecto del tapón osteocondral de minicerdo de Yucatán para demostrar la eficacia de los andamiajes de la matriz dérmica acelular para reparar los defectos óseos subyacentes a los defectos del cartílago articular. Se evaluaron tres formulaciones de implantes y se compararon con un defecto no relleno con ninguna formulación. Las formulaciones ensayadas fueron: (1) masilla XenDerm micronizada (~600 mg/ml) sellada en la superficie con cola de fibrina, (2) XenDerm micronizado (~330 mg/ml) combinado con fibrinógeno y trombina para crear un gel sellado en la superficie con cola de fibrina, o (3) pasta XenDerm micronizada (~330 mg/ml) mantenida en su lugar por una lámina de AlloDerm suturada al perímetro del defecto del cartílago. Por lo tanto, los componentes de la matriz acelular de las formulaciones (1) y (3) diferían solo con respecto a la concentración de XenDerm micronizado (particulado).

Se crearon unilateralmente defectos de espesor completo de 6,4 mm de diámetro y que se extendían a través del cartílago y 5 mm hacia el hueso subcondral en los cóndilos medial y femoral de 2 minicerdos de Yucatán esqueléticamente maduros. Los minicerdos de Yucatán esqueléticamente maduros se escogieron debido a su tamaño anatómico y al espesor del cartílago, que se aproxima al de los seres humanos. Los 2 animales elegidos

eran de edad idéntica y peso similar (82 kg y 84 kg), y se sometieron a un cribado radiográfico preoperatorio para asegurar el tamaño adecuado, la madurez esquelética, y que no existían anomalías óseas obvias.

5 Ambos cerdos fueron anestesiados con Telazol (8 mg/kg), Ketamina (4 mg/kg) y Xilazina (4 mg/kg), IM. Se entubaron y se mantuvieron con isoflurano al 2-3 % y 1-2 l de O<sub>2</sub>/minuto. Los medicamentos preoperatorios incluyeron aproximadamente 40 mg/kg de Cefazolina por vía intravenosa IV, 0,007 mg/kg de Buprenorfina IM, y 0,01 mg/kg de Glicopirrolato IM. El antimicrobiano postoperatorio fue de 3,0 a 3,5 g de Cefazolina IV. La analgesia postoperatoria incluyó 0,007 mg/kg de Buprenorfina IM y 50 y 75 µg/hora de parches de Fentanilo (transdérmico) colocados cada 1-3 días según fuese necesario.

10 Se realizó una incisión lateral que se extendía desde el fémur distal a la tibia proximal, exponiendo la cápsula articular. Se realizó una incisión en el espacio articular para exponer los cóndilos laterales y medial. Se usó una broca de 6,4 mm con una manga para evitar la perforación excesiva de la profundidad del defecto (5 mm) para crear el defecto final. Se usó solución salina estéril para hidratar los compuestos de ensayo antes de la implantación. Después de irrigar el defecto con una solución salina para eliminar los restos óseos y los elementos de médula derramados, se empaquetó el compuesto apropiado en el sitio del defecto con una jeringa y una sonda roma. Se colocó suficiente material en el defecto para que quedara alineado con la superficie de articulación. El espacio de la articulación se lavó abundantemente con solución salina y se cerró con 3-0 PDS con un patrón de sutura interrumpido simple. Las capas muscular y subcutánea se cerraron con 2-0 Prolene con un patrón de sutura continua.

15 Los animales se colocaron en un cabestrillo para cerdo durante al menos 2 horas después del final de la cirugía. Se aplicó una venda de Robert-Jones a la pata operada para disminuir el exceso de movimiento en la articulación de la región rotular (rodilla). Los animales se sometieron a eutanasia 8 semanas después de la cirugía, se extirparon las extremidades posteriores y se procesaron para su análisis.

20 La cicatrización del hueso y del cartílago se evaluó de forma macroscópica e histológica usando protocolos de rutina. Las articulaciones se expusieron y los defectos se fotografiaron. Los defectos se extirparon en bloque y se colocaron en un fijador de formalina durante 3 días. Después de la fijación inicial, los defectos se diseccionaron en 2 mitades para visualizar la remodelación a través de la profundidad del defecto osteocondral. Una mitad se sometió a una descalcificación limitada, se seccionó y se tiñó con H&E y otras tinciones según fue necesario. La segunda mitad se procesó por inmunocitoquímica para determinar la expresión de colágeno tipo II.

35 *Análisis macroscópico*

Cada defecto recogido se inspeccionó para determinar su apariencia macroscópica. Este análisis subjetivo distribuye puntos basados en la formación de lesiones intraarticulares, la restauración de la superficie articular, la erosión y la apariencia del cartílago. La escala de calificación macroscópica se establece a continuación:

	Grado
<u>Adhesiones intraarticulares</u>	
Ninguna =	2
Tejido fibroso suelto mínimo/fino =	1
Tejido fibroso mayor/denso =	0
<u>Restauración del cartílago articular</u>	
Completa =	2
Parcial =	1
Ninguna =	0
<u>Erosión del cartílago</u>	
Ninguna =	2
Sitio y borde del defecto =	1
Sitio del defecto y cartílago normal adyacente =	0
<u>Aspecto del cartílago</u>	
Translúcido =	2
Opaco =	1
Descolorido o irregular =	0
PUNTUACIÓN POSIBLE TOTAL =	8

40 La puntuación en bruto para los 3 materiales de implante y el defecto de control vacío fueron los siguientes:

<u>Material de implante</u>	<u>Puntuación total</u>
Defecto vacío	3
Cymetra	5
Cymetra + Fibrina	6
Masilla de Cymetra	4

Estas observaciones macroscópicas indican una reparación notablemente mejorada de la superficie del cartílago por el defecto relleno de Cymetra/Fibrina en comparación con el control sin tratamiento.

5 Los bloques fijos se dividieron en dos y se fotografiaron, y se muestran en la figura 1. Este análisis muestra la reparación a las 8 semanas en el hueso trabecular subyacente. La reparación ósea significativa es evidente en el defecto relleno de masilla de Cymetra (figura 1, panel D) en comparación con el defecto vacío (figura 1, panel B). La combinación de un polímero de fibrina con Cymetra parece haber inhibido la remodelación ósea (figura 1, panel C), y el defecto relleno con pasta de Cymetra (figura 1, panel A) solo indica una pérdida de volumen significativa con un nuevo material óseo mínimo.

*Inmunohistoquímica e histología*

15 La identificación del cartílago articular de buena fe se puede lograr mediante el estudio de parámetros ultraestructurales y/o bioquímicos. El cartílago articular forma una capa continua de tejido de cartílago que posee zonas identificables. La zona superficial se caracteriza por condrocitos que tienen una morfología aplanada y una red extracelular que se tiñe mal con azul de toluidina, lo que indica la ausencia relativa de glucosaminoglicanos sulfatados (predominantemente agregano). Los condrocitos en las zonas media y profunda tienen una apariencia esférica, y la matriz contiene abundantes proteoglicanos sulfatados, como lo demuestra la tinción con azul de toluidina.

25 La tinción de Von Kossa muestra una tinción negra densa del tejido mineralizado. Esta tinción muestra claramente el hueso existente y el recién regenerado a través de la deposición de plata sobre las sales de calcio. Típicamente, la contratinción es Safranina O, que tiñe el cartílago de color rojo-naranja. El hueso nuevo y el existente se pueden distinguir fácilmente morfológicamente en secciones de esta manera. Safranina O/fast Green es capaz de distinguir más características que el azul de toluidina. Safranina O es un colorante básico que tiñe los proteoglicanos en el cartílago articular de color rojo-naranja y el hueso subcondral subyacente solo ligeramente. Fast Green es un colorante ácido que tiñe el citoplasma de color gris-verde. Esta tinción no solo es capaz de identificar claramente el cartílago existente y regenerado, sino que también puede distinguir las diferencias entre las dos regiones, lo que indica diferencias en el contenido de proteoglicanos.

H&E tiñe el hueso de un color rojo oscuro y el cartílago rico en proteoglicanos solo ligeramente.

35 El tricromo de Masson distingue las diferencias en el tejido reparador. El cartílago y el tejido reparador rico en glucosaminoglicanos sulfatados están teñidos de color rojo, con el colágeno del hueso teñido de color azul.

40 La evaluación histológica puede implicar la evaluación de uno o más de los siguientes: contenido de glucosaminoglicanos en el cartílago de reparación; morfología del cartílago y condrocitos; y la integridad estructural y la morfología en la interfaz del defecto. La morfología del cartílago de reparación puede identificarse por el tipo de cartílago formado: articular frente a fibrótico por contenido de glucosaminoglicanos, grado de deposición de cartílago, organización de las células y fibras de colágeno.

45 La presencia de colágeno tipo II en tejido de cartílago es un marcador fenotípico aceptado de condrocitos diferenciados. La electroforesis en gel estándar, el análisis de Western blot, y/o la tinción inmunohistoquímica pueden determinar la presencia de colágeno II. La tinción para los tipos de colágeno I y II es útil para determinar el límite entre el hueso subcondral regenerado y el tejido reparador. Generalmente, el tejido reparador que es fibroso se tiñe menos intensamente. Además, el hueso subcondral recién formado puede identificarse mediante la localización del colágeno tipo II en pequeñas espículas de cartílago remanente.

50 O'Driscoll ha desarrollado una escala común utilizada para evaluar la reparación de defectos osteocondrales, y aquí se muestra una modificación:

<b>Parámetro</b>	<b>Puntos</b>
<i>Morfología tisular</i>	
Mayormente cartílago hialino	3
Mayormente fibrocartílago	2
Mayormente sin cartílago	1
Sin cartílago solamente	0
<i>Tinción de matriz (Safranina O)</i>	

<b>Parámetro</b>	<b>Puntos</b>
Normal o casi normal	3
Moderada	2
Ligera	1
Ninguna	0
<i>Integridad estructural</i>	
Normal	4
Principio de organización columnar	3
Sin organización	2
Quistes o interrupciones	1
Desintegración severa	0
<i>Agrupación de condrocitos</i>	
Sin agrupaciones	2
<25 % de las células	1
25-100 % de las células	0
<i>Formación de línea de mineralización</i>	
Completa	4
76-90 %	3
50-75 %	2
25-49 %	1
<25 %	0
<i>Formación de hueso subcondral</i>	
Buena	2
Ligera	1
Sin formación	0
<i>Arquitectura de superficie</i>	
Normal	3
Ligera fibrilación o irregularidad	2
Fibrilación o irregularidad moderada	1
Fibrilación o alteración grave	0
<i>Relleno del defecto</i>	
111-125 %	3
91-110 %	4
76-90 %	3
51-75 %	2
26-50 %	1
<25 %	0
<i>Integración lateral</i>	
Unido en ambos extremos del injerto	2
Unido en un extremo/parcialmente en ambos lados	1
No unido	0
<i>Integración basal</i>	
91-100 %	3
70-90 %	2
50-70 %	1
<50 %	0
<i>Inflamación</i>	
Sin inflamación	4
Ligera inflamación	2
Inflamación fuerte	0
<b>Puntos máximos posibles</b>	<b>34</b>

5 El defecto vacío no mostró esencialmente nueva formación de hueso, con el tamaño del defecto sin cambios; sin embargo, hubo evidencia de una formación limitada de cartílago que recubría el tejido fibrótico y que penetraba por las paredes del defecto. La reparación ósea más robusta se observó en el defecto relleno de masilla de Cymetra conteniendo más del 70 % del defecto hueso trabecular. En contraste, aunque la combinación de Cymetra/Fibrina parecía ser inhibidora de la remodelación ósea con el defecto relleno con material de matriz original, la reparación del cartílago observada con este implante fue superior al defecto vacío y a otros materiales de implante.

10 La puntuación de estos implantes para la reparación osteocondral, que incluye tanto la reparación del hueso como la del cartílago, es la siguiente:

<u>Implante</u>	<u>Puntuación total</u>
Defecto vacío	7
Cymetra	17
Cymetra + Fibrina	17
Masilla de Cymetra	18

5 Todo el material del implante obtuvo una puntuación significativamente mejor que el control sin tratamiento. Sin embargo, se observó que la combinación de Cymetra/Fibrina obtuvo mejores resultados en las medidas de reparación del cartílago, y la masilla Cymetra obtuvo mejores resultados en la reparación del hueso trabecular. Sin embargo, en comparación con los defectos no tratados, las combinaciones de implantes de matriz acelular fueron osteoconductoras (es decir, permitieron la reparación ósea), y actúan como un andamio para la reparación del cartílago.

10 Ejemplo 3. Remodelación del periostio en el modelo de defecto segmentario porcino

15 Se creó quirúrgicamente un defecto segmentario en el eje medio que medía dos veces el diámetro del hueso (aproximadamente 3 cm) unilateralmente en un fémur de cada uno de los dos cerdos. Por lo tanto, el defecto era un defecto de tamaño crítico que no sanaría espontáneamente. Se aplicó una placa ósea metálica fijada al hueso con tornillos a través del defecto, fijando así el hueso osteomizado en una posición anatómica correcta. Se reconstituyó una lámina de XenDerm sumergiéndola en una solución salina durante aproximadamente diez minutos antes de la aplicación quirúrgica. La lámina de XenDerm estaba envuelta alrededor del defecto óseo cilíndrico creando un tubo. La lámina se solapó en los extremos proximal y distal del hueso a cada lado del hueco aproximadamente 5 mm y se sujetó con suturas al periostio. Antes del cierre del tubo de XenDerm, el tubo definido por la lámina de XenDerm se llenó con una mezcla 1:1 de gránulos OSTEOSET® (sulfato cálcico) y hueso de autoinjerto esponjoso obtenido del húmero proximal del cerdo receptor. Después de llenar el tubo con los materiales del injerto, la lámina de XenDerm se cerró a lo largo de su longitud como una costura con suturas con un patrón continuo.

25 El análisis radiográfico se realizó después de la operación, y en puntos de tiempo de tres y seis semanas. El análisis histológico se realizó al final del estudio de seis semanas. Se realizaron tinciones de rutina con hematoxilina y eosina (H&E) en las secciones de defectos segmentarios.

30 Los cerdos reanudaron la carga de peso en las extremidades operadas a los 5 días de la cirugía y las heridas cicatrizaron de manera rutinaria. Las radiografías postoperatorias y de tres semanas mostraron que los defectos permanecieron estabilizados en ambos cerdos sin fractura del hueso ni rotura de las placas o tornillos. Cada cerdo tenía un tornillo aflojado tres semanas después de la cirugía y varios tornillos se aflojaron en un cerdo a las seis semanas. Después de seis semanas, ambos cerdos tuvieron una reacción perióstica (que dio como resultado la formación de callo) sobre el aspecto craneal y lateral del fémur que incluía la placa en diversos grados. Estaban presentes cantidades variables de hueso nuevo en los defectos de ambos cerdos. Los extremos proximal y distal del fémur nativo presentaron proliferación de hueso desde las superficies perióstica, cortical y medular. Este hueso se extendió al defecto como una fase inicial de restablecimiento del canal medular diafisario.

40 Las radiografías *post mortem* (figura 2) muestran una cantidad considerable de hueso nuevo formado en el defecto, que se parece a una estructura tubular temprana que parece penetrar dentro de los márgenes de la membrana implantada. Aunque no se reconstruyó una estructura tubular sólida por completo en este punto inicial de las seis semanas, hubo puntales de formación de hueso nuevo que cubrían los defectos.

45 Las secciones histológicas de los dos cerdos indican que la matriz acelular (XenDerm) funciona como una guía bioquímica y física para la formación de hueso nuevo en un defecto segmental proporcionando un entorno para la cicatrización. Las secciones histológicas demuestran la formación de hueso nuevo que penetra dentro de la matriz tridimensional de las matrices implantadas. Por lo tanto, los haces de colágeno de la matriz se ven entrelazados con hueso recién formado, lo que indica que realmente se formó hueso nuevo dentro de la matriz y también adyacente a ella. Parte del hueso nuevo dentro de la matriz apareció desde la histología para formarse a través de una fase cartilaginosa inicial.

50 Este estudio indica la capacidad de la matriz acelular para proteger un sitio de defecto óseo subyacente y proporcionar un entorno protegido para la cicatrización en un modelo de defecto segmentario desafiante. Las matrices injertadas permanecieron en el sitio del defecto y había abundante actividad celular dentro de las propias matrices. De hecho, se formó un nuevo hueso dentro de las matrices, así como a lo largo de sus márgenes. Por lo tanto, parece que las matrices dérmicas acelulares implantadas (XenDerm) se remodelaron para funcionar de una manera esencialmente igual que el periostio normal en la estimulación de la formación de hueso nuevo adyacente a él, y también indujeron la formación de hueso nuevo dentro de sí mismo.

Ejemplo de referencia: Uso de matrices acelulares para corregir defectos del miocardio congénito y su reparación

Ventrículos cardiacos dañados

Se ensayan dos modelos de injerto de corazón heterotópico de rata. Uno es un modelo de un defecto ventricular isquémico (el "modelo de isquemia") y el otro es un modelo de hiperplasia congénita del corazón izquierda (el "modelo de corazón izquierdo hipoplásico"). En el modelo de isquemia, se liga la arteria coronaria principal izquierda, se extirpa el área isquémica, y el segmento relevante del miocardio se reemplaza con una matriz que tiene proporciones idénticas al segmento extirpado. La manipulación conserva la forma y geometría ventricular general. El modelo de corazón izquierdo hipoplásico no implica ligadura o escisión arterial, sino incisión y expansión de parche de la pared ventricular izquierda, según sea necesario para agrandar el tamaño total de la cavidad ventricular. Además, en ambos modelos, al manipular apropiadamente las conexiones anastomóticas del corazón del donante [Ono et al. (1969) J. Thor. Cardiovasc. Surg. 57:225-229; Asfour et al. (1999) J. Heart and Lung Transplantation 18:927-936], es posible crear un ventrículo izquierdo funcional (es decir, de llenado ventricular normal) o descargado (ventrículo derivado). La matriz implantada en el ventrículo está construida en dos capas con una capa de 1 mm de Gore-Tex™ (politetrafluoroetileno; PTFE) (W.L. Gore & Associates, Inc., Flagstaff, AZ) para mayor resistencia y soporte, y una capa interna de matriz acelular (por ejemplo, AlloDerm®, XenoDerm, o una matriz vascular acelular) para guiar la regeneración tisular. Como alternativa, se pueden usar dos láminas de matriz acelular con matriz particulada entre las láminas.

Las ratas Lewis macho singénicas sirvieron como donantes y receptores cardiacos en el modelo de trasplante de corazón heterotópico que se ha descrito extensamente [Ono et al., anteriormente; Asfour et al., anteriormente]. Después de la heparinización sistémica y la cardioplejía fría del donante, se extrae el corazón del donante del tórax con cuatro ligaduras separadas, uniendo la vena cava superior (VCS), la vena cava inferior y el pulmón derecho e izquierdo, incluida la VCS izquierda.

Para crear el modelo de corazón izquierdo hipoplásico, se realiza una incisión de 5 mm en el ventrículo izquierdo lateral con respecto a la arteria descendente anterior izquierda. La cavidad ventricular se expande luego mediante la inserción de una construcción de dos capas de 4 mm x 4 mm x 2 mm (como se ha descrito anteriormente). La construcción completa se asegura luego en su lugar con una sutura 80 de nylon de bloqueo continua. La sutura de bloqueo consigue adecuadamente la hemostasia y es poco probable que el sangrado en esta anastomosis sea un problema. La implantación de este injerto por anastomosis terminolateral del arco aórtico del donante a la aorta infrarrenal receptora y la arteria pulmonar del donante a la vena cava inferior infrarrenal receptora crea un ventrículo izquierdo totalmente descargado y el corazón trasplantado funciona como un cortocircuito arteriovenoso. La sangre arterial oxigenada pasa a través de la aorta receptora a la aorta donante y a las arterias coronarias, perfunde el miocardio y se drena a través del seno coronario hacia la aurícula y el ventrículo derecho para expulsarla a la vena cava inferior receptora. Una modificación menor puede crear un ventrículo izquierdo totalmente funcional cargado de volumen a través de la anastomosis de la arteria pulmonar donante a la aurícula izquierda donante. El corazón se trasplanta entonces mediante una anastomosis de extremo a lado de la VCS donante a la vena cava inferior infrarrenal receptora y una anastomosis de extremo a lado del arco aórtico donante a la aorta infrarrenal receptora. La sangre venosa de la vena cava inferior receptora ingresa a la VCS donante, pasa a través de la aurícula y el ventrículo derecho, y se expulsa hacia la aurícula izquierda donante. Después de pasar a través de la aurícula y el ventrículo izquierdo, se expulsa a la aorta receptora.

El modelo de isquemia de los corazones del ventrículo izquierdo sin carga y totalmente cargado se crea mediante una ligera modificación de esta técnica con ligadura de la arteria descendente anterior justo distal a la primera rama diagonal, la escisión de espesor completo de un área de 4 mm x 4 mm de la pared ventricular izquierda se volvió isquémica, y la implantación de la construcción de 4 mm x 4 mm x 2 mm en el defecto. Esta reconstrucción conserva la geometría general del ventrículo izquierdo. Los animales de control se someten a un procedimiento idéntico, excepto que no se extirpa el miocardio y no se implanta un parche ventricular.

Una ventriculostomía sencilla con cierre inmediato sirve como control para el modelo hipoplásico y la ligadura de la arteria descendente anterior izquierda sin escisión del miocardio isquémico sirve como control para el modelo de isquemia.

Los cuatro grupos experimentales son los siguientes: (1) Isquémico y cargado + matriz; (2) Isquémico y descargado + matriz; (3) Hipoplásico y cargado + matriz; y (4) Hipoplásico y descargado + matriz.

Los cuatro grupos de control son los siguientes: (1) Isquémico y cargado, sin matriz; (2) Isquémico y descargado, sin matriz; (3) Hipoplásico y cargado, sin matriz; y (4) Hipoplásico y descargado, sin matriz.

Alloderm, XenoDerm, y una matriz vascular acelular equivalente se ensayan en experimentos separados.

Al finalizar el procedimiento quirúrgico, se permite la recuperación de los animales con acceso libre a comida y agua. Los animales de todos los grupos reciben 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) en el agua (0,8 mg/ml) durante la duración del experimento y se analizan para determinar la regeneración del miocardio en un mes y dos meses

después del trasplante. En estos puntos de tiempo, los animales se sacrifican y los corazones se fijan en distensión con formalina tamponada con fosfato al 10 %, se incluyen en parafina, y las áreas representativas que incluían la matriz extracelular implantada se seccionaron en cortes coronales de 5 micrómetros. Una porción de estas secciones se tiñe con H&E y la morfología, celularidad y patrón organizativo del crecimiento interno celular se compara con el del corazón circundante. Dado que BrdU es un análogo de timidina que se incorpora al ADN durante la fase S del ciclo celular, solo las células que se han dividido pueden incorporar el análogo nucleotídico. Mediante evaluación inmunohistoquímica utilizando tanto anticuerpos específicos de cardiomiocitos, tal como anticuerpos monoclonales anti-miosina de cadena pesada (Sigma), como anticuerpos monoclonales anti-troponina C de ratón (Novocastra Laboratories Ltd.), así como anticuerpos específicos anti-BrdU, pueden identificarse miocitos cardíacos o precursores de miocitos que se han dividido y diferenciado en músculo cardíaco. La vascularidad del tejido neoventricular se evalúa contando la densidad capilar y arterial después de la tinción inmunohistoquímica del endotelio vascular con anticuerpo de células anti-endoteliales de ratón (CD31; PECAM-1) (Dako Corp., Carpinteria, CA). La comparación cuantitativa de la regeneración entre los grupos experimentales y de control se realiza contando los números de miocitos cardíacos en regeneración que han incorporado BrdU.

La función del miocardio se evalúa utilizando una preparación Langendorff de mesa. Después de la heparinización sistémica, el corazón heterotópico se aislará y se perfundirá en un aparato Langendorff con tampón Krebs-Henseleit filtrado equilibrado con dióxido de carbono al 5 % y oxígeno al 95 % [Fremes et al. (1995) *Annals. Thor. Surg.* 59:1127-1133]. Un globo de látex se pasa al ventrículo izquierdo a través de la válvula mitral y se conecta a un transductor de presión. Después, se aumenta el tamaño del globo en aumentos de 0,02 ml desde 0,04 a 0,46 ml mediante la adición de una solución salina mientras se registran las presiones sistólica y diastólica. La presión desarrollada en cada volumen refleja la función ventricular izquierda y se calcula como la diferencia entre la presión sistólica y diastólica.

El potencial de regeneración de las matrices acelulares particuladas administradas directamente a un área de la cicatriz del miocardio se investiga en una serie separada de experimentos. Para estudiar este fenómeno, se extirpa el corazón del donante como se ha descrito anteriormente y se liga la arteria coronaria principal izquierda. El corazón del donante luego se trasplanta al abdomen de un receptor singénico para crear un ventrículo izquierdo cargado o descargado como se ha descrito anteriormente.

Un mes después del infarto, al finalizar la remodelación de la cicatriz y la lisis de la matriz por la respuesta inflamatoria, el corazón heterotópico se detiene temporalmente por cardioplejía fría y en el área del infarto se inyecta la forma micronizada de AlloDerm (es decir, Cymetra) y XenoDerm respectivamente en dos grupos experimentales separados. Un grupo de control se somete a la misma manipulación, excepto que la solución salina solo se inyecta en el área de la cicatriz.

Los cuatro grupos experimentales son los siguientes: (1) Isquémico y cargado + AlloDerm micronizado; (2) Isquémico y descargado + AlloDerm micronizado; (3) Isquémico y cargado + XenoDerm micronizado; y (4) Isquémico y descargado + XenoDerm micronizado.

Los dos grupos de control son los siguientes: (1) Isquémico y cargado + solución salina solamente; y (2) Isquémico y descargado + solución salina solamente.

Al finalizar el procedimiento quirúrgico, se permite la recuperación de los animales con acceso libre a comida y agua. A los animales tanto de los grupos experimentales como de control se les administra (BrdU) en el agua (véase anteriormente) mientras dura el experimento y se analizan dos semanas, un mes, dos meses y tres meses después del trasplante por los procedimientos descritos anteriormente. La tinción inmunohistoquímica para proteínas estructurales específicas de cardiomiocitos y BrdU se usan para identificar miocitos cardíacos o precursores de miocitos cardíacos que han dividido y repoblado el área de la cicatriz o matriz extracelular.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición para su uso en el tratamiento de un sujeto mamífero que tiene un defecto óseo, que comprende:  
un gel, pasta o masilla hidratados que incluyen una mezcla de una matriz dérmica acelular particulada y polvo de hueso desmineralizado adaptados para colocarse en el defecto óseo del sujeto mamífero.
- 10 2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el sujeto mamífero es un ser humano.
3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la composición comprende además células viables histocompatibles con el sujeto mamífero.
- 15 4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde las células se seleccionan del grupo que consiste en células epidérmicas, queratinocitos, células endoteliales, fibroblastos, células madre embrionarias de origen no humano, células madre mesenquimales adultas o embrionarias de origen no humano, células madre del cordón umbilical, procondroblastos, condroblastos, condrocitos, pro-osteoblastos, osteocitos, osteoclastos, monocitos, pro-cardiomioblastos, pericitos, cardiomioblastos, cardiomiocitos, células epiteliales gingivales y células madre del ligamento periodontal.
- 20 5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en un factor de crecimiento celular, un factor angiogénico, un factor de diferenciación, una citocina, una hormona y una quimiocina.
- 25 6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde el o los agentes están en la composición colocada en el defecto óseo del sujeto mamífero.
7. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, donde la composición comprende uno o más vectores de expresión que contienen una o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican el o los agentes, donde cada una de la o las secuencias de ácidos nucleicos está unida operativamente a un elemento regulador de la transcripción o la traducción.
- 30 8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, donde el o los vectores de expresión están en una o más células que están adaptadas para administrarse al sujeto mamífero.
- 35 9. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, donde la o las células están en la composición.
- 40 10. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la composición está adaptada para colocarse dentro del defecto óseo.
11. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además una lámina de matriz tisular acelular adaptada para cubrir el defecto óseo.

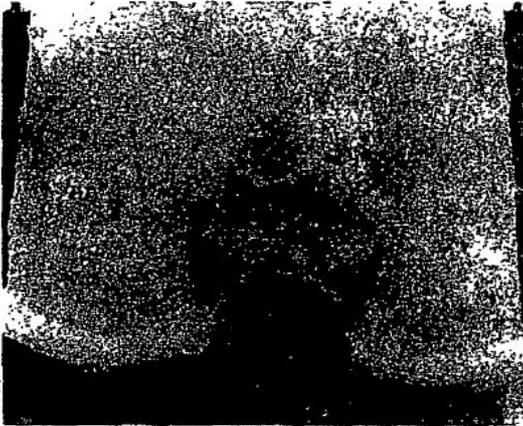


FIG. 1A

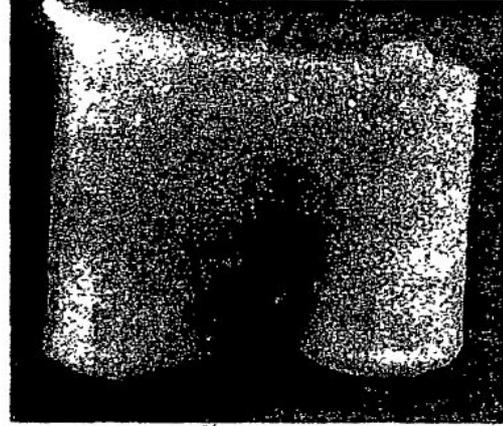


FIG. 1B

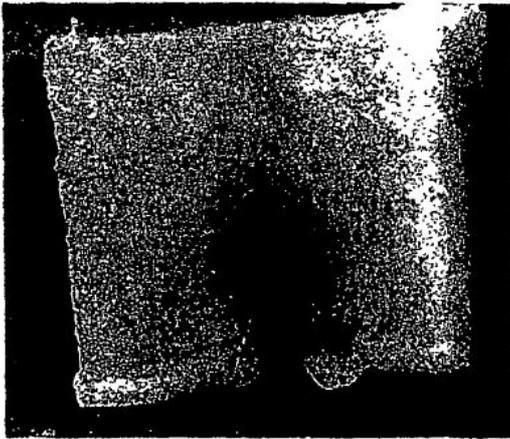


FIG. 1C

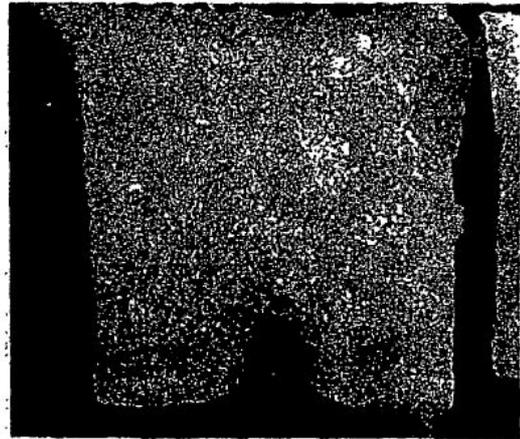
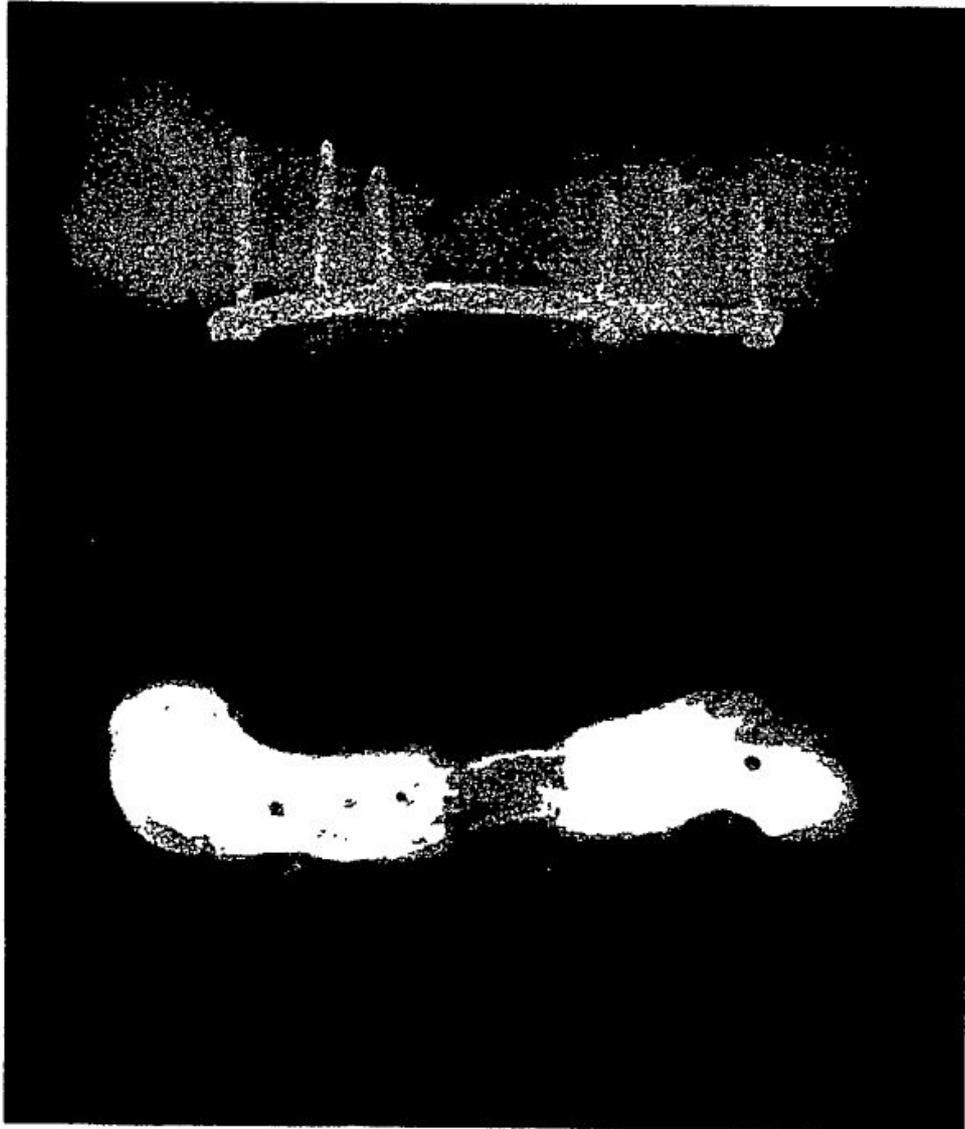


FIG. 1D



**FIG. 2**