

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 677 945**

51 Int. Cl.:

<b>A61L 27/26</b>	(2006.01)	<b>C12N 5/071</b>	(2010.01)
<b>A61L 27/36</b>	(2006.01)		
<b>A61L 27/38</b>	(2006.01)		
<b>A61L 27/60</b>	(2006.01)		
<b>A61K 35/33</b>	(2015.01)		
<b>A61K 35/36</b>	(2015.01)		
<b>A61K 35/51</b>	(2015.01)		
<b>C12N 5/00</b>	(2006.01)		
<b>C12N 5/073</b>	(2010.01)		
<b>C12N 5/079</b>	(2010.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.08.2010 PCT/ES2010/070569**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.03.2011 WO11023843**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.08.2010 E 10811319 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2471902**

54 Título: **Producción de tejidos artificiales mediante ingeniería tisular utilizando biomateriales de fibrina y agarosa**

30 Prioridad:

**25.08.2009 ES 200930625**  
**02.11.2009 ES 200930943**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.08.2018**

73 Titular/es:

**SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (50.0%)**  
**Avda. de la Constitución 18**  
**41001 Sevilla, ES y**  
**UNIVERSIDAD DE GRANADA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ALAMINOS MINGORANCE, MIGUEL;**  
**MUÑOZ ÁVILA, JOSÉ IGNACIO;**  
**GONZÁLEZ ANDRADES, MIGUEL;**  
**CAMPOS MUÑOZ, ANTONIO y**  
**GARZÓN BELLO, INGRID JOHANNA**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 677 945 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

Producción de tejidos artificiales mediante ingeniería tisular utilizando biomateriales de fibrina y agarosa

- 5 La presente invención se encuadra en el campo de la biomedicina y, más específicamente, de la ingeniería tisular. Específicamente, se refiere a un método de preparación *in vitro* de un tejido artificial, al tejido artificial obtenible por dicho método y al uso de este tejido artificial para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano dañado.

10 **Estado de la técnica anterior**

La ingeniería tisular constituye un conjunto de técnicas y disciplinas que permite diseñar y generar en laboratorio tejidos artificiales a partir de células madre procedentes de muestras tisulares obtenidas de biopsias y, por tanto, supone un enorme avance en el trasplante de órganos y en la medicina regenerativa. La ingeniería tisular es una de las áreas de la biotecnología que más se ha desarrollado en los últimos años, debido a su utilidad potencial para la fabricación *in vitro* de tejidos y órganos para su implante en pacientes que necesitan estos tejidos. No obstante, los tejidos artificiales descritos hasta la fecha presentan numerosos problemas y complicaciones; algunos de los cuales se exponen a continuación, utilizando, como ejemplo, los tejidos artificiales de piel, córnea, vejiga y uretra.

20 La vejiga urinaria es el órgano encargado de la recepción y el almacenamiento de la orina. Situada en el suelo pélvico, la vejiga urinaria se caracteriza por su capacidad y su distensibilidad, lo que la permite almacenar y retener la orina. La continencia es resultado de la contracción del esfínter urinario, que cierra la uretra y el cuello vesical impidiendo la salida de orina, así como de la relajación y distensión de la vejiga para almacenar la orina que se va acumulando en ella. Numerosas patologías congénitas o adquiridas pueden afectar a la integridad de la vejiga, alterando la función continente de ésta. Por un lado, las malformaciones de la vejiga suelen asociarse a defectos graves de la pared vesical que requieren reparación quirúrgica urgente. Por otro lado, los traumatismos pélvicos, el cáncer vesical y las lesiones traumáticas de la médula espinal constituyen patologías frecuentes que requieren el uso de tejidos extravasculares para reparar la vejiga dañada. En este contexto, actualmente se llevan a cabo ampliaciones vesicales utilizando intestino (enterocistoplastia), estómago (gastrocistoplastia) o urotelio (ureterocistoplastia), siendo muy frecuentes las complicaciones asociadas a estas técnicas.

Hasta el momento, se han descrito muy pocos modelos de sustitutos de la vejiga urinaria que presenten utilidad clínica. Recientemente (Atala et al. Lancet. 15 de abril de 2006; 367(9518):1241-6), investigadores del Children's Hospital de Boston lograron implantar un sustituto de vejiga artificial generado a partir de colágeno y ácido poliglicólico en siete pacientes con daño vesical grave. Sin embargo, los modelos de vejiga artificial, disponibles para el tratamiento de los pacientes que lo necesitan, son muy escasos y presentan multitud de inconvenientes, incluyendo la mala calidad y la escasa manipulabilidad de los tejidos generados. Además, el colágeno es un producto que tiende a la contracción y a la pérdida de volumen cuando se usa en ingeniería tisular, siendo escasa su consistencia y, por tanto, su manipulabilidad quirúrgica.

40 La uretra es el conducto por el que se elimina hacia el exterior la orina almacenada en la vejiga urinaria. Además de su función excretora en ambos sexos, la uretra cumple una función reproductora en el hombre, al permitir el paso del contenido seminal desde las vesículas seminales durante la eyaculación. Son múltiples las afecciones congénitas (hipospadias y epispadias principalmente) o adquiridas (traumatismos, estenosis, etc.) que afectan a su integridad funcional y que precisan que sea sustituida en mayor o menor grado, para conseguir restablecer su función normal (Baird et al. J Urol. 2005; 174:1421-4; Persichetti et al. Plast Reconstr Surg. 2006; 117:708-10).

Tradicionalmente, la reparación de tejidos lesionados se ha venido haciendo con elementos protésicos artificiales o tejidos tomados de una parte del propio paciente (autoinjerto o autotrasplante) o de otro individuo (trasplante heterólogo). Actualmente, para la corrección de la mayor parte de las patologías uretrales, se recurre a colgajos autólogos de tejidos adyacentes o a injertos libres, principalmente de mucosa oral o vesical. Sin embargo, la obtención de colgajos locales no siempre es factible, y la extracción de mucosa oral o vesical no está exenta de complicaciones y efectos secundarios tanto en la zona donante como en la receptora (Corvin et al. Urologe A. 2004; 43(10):1213-6; Schultheiss et al. World J Urol. 2000; 18: 84-90). Por otro lado, la utilización de tejidos heterólogos ha arrojado resultados bastante pobres en la sustitución de uretra, siendo muy frecuente la aparición de rechazos inmunológicos del tejido trasplantado.

Hasta la fecha, se han descrito muy pocos modelos de sustitutos de uretra con probable utilidad clínica, siendo muy escasos los casos descritos en la bibliografía, en los que se ha implantado un sustituto uretral en pacientes. La mayoría de los modelos descritos hasta la fecha se basan en biomateriales de colágeno (De Filippo et al. J Urol. Octubre de 2002; 168(4 Pt 2):1789-92; El-Kassaby et al. J Urol. Enero de 2003; 169(1):170-3; comentario 173) o en piel del propio paciente (Lin et al. Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 20 de abril de 2005; 85(15):1057-9). Sin embargo, todos estos modelos presentan numerosos problemas y complicaciones, y aún no se ha desarrollado ningún sustituto uretral exento de estos problemas. Por un lado, el colágeno es un producto que tiende a la contracción y a la pérdida de volumen cuando se usa en ingeniería tisular, siendo escasa su consistencia y, por tanto, su manipulabilidad quirúrgica. Por otro lado, el uso de piel autóloga aún no ha demostrado suficientemente su capacidad para

adaptarse a las condiciones de la uretra, siendo muy difícil recelularizar fragmentos de dermis descelularizados.

La córnea es una estructura transparente que carece de vasos, a través de la cual la luz penetra en el ojo, constituyendo la principal barrera del globo ocular con el medio exterior. Por ese motivo, la integridad y el correcto funcionamiento de la misma son imprescindibles para una correcta función visual. La patología congénita o adquirida de la córnea constituye uno de los problemas más frecuentes en oftalmología, siendo numerosas las causas que provocan una alteración grave de la fisiología y la estructura corneal. En estos casos, suele ser necesario recurrir a tratamientos agresivos y no exentos de complicaciones, como son los implantes de membrana amniótica, los diferentes tipos de queratoprótesis e incluso el trasplante heterólogo de córnea (queratoplastia). Sin embargo, el trasplante corneal es una técnica que depende enormemente de la disponibilidad de córneas procedentes de donantes cadavéricos, lo cual hace que un gran número de personas permanezcan en lista de espera para trasplante durante periodos de tiempo prolongados. Por otro lado, es bien sabido que el trasplante de órganos procedentes de un donante está sujeto a la posibilidad de rechazo inmunológico cuando estos órganos son implantados, obligando al paciente a someterse a terapia inmunosupresora durante toda su vida. Finalmente, el trasplante de cualquier tipo de órgano o tejido, incluida la córnea, es una técnica sujeta a la posibilidad de transmitir todo tipo de enfermedades infecciosas del donante al receptor, incluyendo el VIH, la hepatitis, el herpes, las enfermedades bacterianas y fúngicas, etc. Todos estos problemas y complicaciones derivados del implante corneal, hacen necesaria la búsqueda de alternativas terapéuticas al trasplante heterólogo.

La producción en laboratorio de un sustituto corneal (construcción corneal o córnea artificial) es una de las áreas que está experimentando mayor auge dentro de la ingeniería tisular, siendo numerosos los laboratorios que actualmente están intentando, sin demasiado éxito, conseguir un sustituto corneal de calidad que pueda utilizarse en la práctica clínica humana o para la evaluación de productos farmacológicos y químicos (Griffith et al. *Functional human corneal equivalents constructed from cell lines*. *Science*. 1999; 286(5447):2169-72; Orwin et al. *Tissue Eng*. 2000; 6(4):307-19; Reichl et al. *Int J Pharm*. 2003; 250:191–201). En este sentido, se han desarrollado córneas artificiales de origen animal y humano. En ambos casos, los modelos desarrollados han utilizado biomateriales diversos como el colágeno de tipo I, fibroina procedente de la seda (Higa y Shimazaki. *Cornea*. Septiembre de 2008; 27 Suppl 1:S41-7), quitosano (Gao et al. *J Mater Sci Mater Med*. Diciembre de 2008; 19(12):3611-9), ácido poliglicólico (Hu et al. *Tissue Eng*. Nov-Dic de 2005; 11(11-12):1710-7) y fibrina con agarosa (Alaminos et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci (IOVS)*. 2006; 47: 3311-3317; González-Andrades et al. *J Tissue Eng Regen Med*. 5 de mayo de 2009). De todos estos biomateriales, los mejores resultados obtenidos hasta ahora son los que tienen como base fibrina y agarosa. Las córneas de colágeno de tipo I presentan tendencia a la pérdida de volumen y a la retracción de las mismas, con el inconveniente añadido del origen animal del colágeno utilizado. La fibroina y el quitosano son productos generados a partir de animales invertebrados, lo cual genera problemas significativos en relación con la biocompatibilidad. En cambio, las córneas desarrolladas de fibrina y agarosa tienen la ventaja de que contienen fibrina procedente de la sangre del mismo paciente, mientras que la agarosa constituye un producto inerte desde el punto de vista inmunológico.

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano, y juega un papel fundamental en el mantenimiento del equilibrio interno, formando la principal barrera protectora del organismo frente a cualquier tipo de agresión externa. Existen numerosas patologías que afectan a la piel, siendo las más frecuentes las heridas, las úlceras por presión y las quemaduras. Los tratamientos actuales, basados en el uso de colgajos o injertos de piel o incluso en el implante de piel procedente de donante, están asociados a numerosos problemas.

La necesidad de solucionar estos problemas hace necesaria la búsqueda de alternativas basadas en la generación de productos de piel artificial humana generados mediante ingeniería tisular (Horch et al. *Burns*. Agosto de 2005; 31(5):597-602). En concreto, hasta el momento se han diseñado distintos tipos de piel artificial, incluyendo coberturas cutáneas sintéticas y biológicas, aunque ninguno de ellos ha logrado reproducir fielmente la estructura y las funciones de la piel humana natural. Por un lado, las coberturas dérmicas sintéticas consisten en biomateriales no reabsorbibles y exentos de células vivas que se pueden utilizar como coberturas temporales o como agentes inductores de la reparación tisular guiada. Estos tejidos artificiales e inertes poseen muy poca actividad biológica, por lo que no pueden utilizarse en lesiones profundas o amplias. Por otro lado, las coberturas biológicas consisten en la utilización de piel humana artificial en la que existen células vivas y matrices extracelulares que tratan de reproducir la estructura de la piel humana normal. Hasta el momento, la piel humana artificial que mejores resultados está ofreciendo es la piel artificial generada mediante ingeniería tisular a partir de células madre de la piel utilizando como biomaterial fibrina procedente de plasma humano (Meana et al. *Burns* 1998; 24: 621-630; Del Rio et al. *Hum Gene Ther*. 20 de mayo de 2002; 13(8):959-68; Llames et al. *Transplantation*. 15 de febrero de 2004; 77(3):350-5; Llames et al. *Cell Tissue Bank* 2006; 7: 4753.). Aunque estas técnicas supusieron un gran avance, su utilización clínica es limitada principalmente debido a su escasa consistencia, su difícil manipulación y su extrema fragilidad. Uno de los sustitutos de tejido más consistentes es aquel que combina el uso de fibrina con agarosa. Hasta el momento, la agarosa se ha utilizado para la generación de sustitutos del cartílago (Miyata et al. *J Biomech Eng*. Octubre de 2008; 130(5):051016), la córnea (Alaminos et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci (IOVS)*. 2006; 47: 3311-3317) y la mucosa oral humana (Alaminos et al. *J Tissue Eng Regen Med*. Sep-Oct de 2007; 1(5):350-9; Sánchez-Quevedo et al. *Histol Histopathol*. Junio de 2007; 22(6):631-40), pero no existe experiencia previa en el uso de este biomaterial para la fabricación de piel artificial.

La ingeniería tisular es una de las áreas que está experimentando mayor auge dentro de la biotecnología. Sin embargo, las desventajas de los tejidos artificiales hasta ahora existentes, hacen necesario el desarrollo de nuevas técnicas que permitan la obtención de tejidos artificiales que puedan utilizarse en la práctica clínica humana o para la evaluación de productos farmacológicos y químicos, superando las limitaciones hasta ahora detectadas.

5

### Sumario de la invención

En un primer aspecto, la invención se refiere a un método de preparación *in vitro* de un tejido artificial que comprende:

10

- a) añadir una composición que comprende fibrinógeno a una muestra de células aisladas,
- b) añadir un agente antifibrinolítico al producto resultante de la etapa (a),
- c) añadir, al menos, un factor de coagulación, una fuente de calcio, trombina, o cualquier combinación de los anteriores, al producto resultante de la etapa (b),
- 15 d) añadir una composición de un polisacárido al producto resultante de la etapa (c),
- e) cultivar células aisladas en o sobre el producto resultante de la etapa (d), e
- f) inducir la nanoestructuración del producto resultante de la etapa (e), comprendiendo dicha inducción de nanoestructuración la deshidratación y/o compresión mecánica del producto resultante de la etapa (e), y siendo el polisacárido de la etapa (d) agarosa.

20

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un tejido artificial obtenible por el método de la invención.

En un tercer aspecto, la invención se refiere tejido artificial de la invención para su uso en medicina.

25

En un cuarto aspecto, la invención se refiere al tejido artificial de la invención para su uso en incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano enfermo o dañado.

En un quinto aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención.

30

### Breve sumario de las figuras

**Figura 1.** Muestra un esquema del método utilizado para la nanoestructuración del tejido artificial.

35

**Figura 2.** Muestra la evaluación del producto de piel humana artificial. A. Análisis microscópico *in vitro*. B. Análisis macro y microscópico de la piel humana artificial evaluada *in vivo*. C. Análisis inmunohistoquímico.

40

**Figura 3.** Muestra la evaluación del producto de piel humana artificial con células de la gelatina de Wharton. A. Determinación de la viabilidad de las células madre de la gelatina de Wharton. B. Análisis microscópico. C. Análisis inmunohistoquímico de las siguientes proteínas: pancitoqueratina (PANC), queratina 1 (KRT1), queratina 10 (KRT10), involucrina (INVOL) y filagrina (FILAG).

45

**Figura 4.** Muestra la evaluación de los productos corneales. A. Análisis microscópico e inmunohistoquímico: inmunofluorescencia de diferentes proteínas relacionadas con uniones intercelulares en el epitelio de las córneas humanas control (C) y de los productos corneales mantenidos *in vitro* en diferentes estadios de maduración y desarrollo (1: córnea con una única capa de epitelio, 2: córnea con 2-3 capas, 3: córnea con epitelio estratificado, 4: córnea con epitelio estratificado y sometido a técnica aire-líquido). B. Control de calidad reológico. C. Control de calidad óptica. D. Control genético: Principales funciones génicas expresadas por las construcciones corneales artificiales generadas mediante ingeniería tisular. E. Evaluación *in vivo* del comportamiento clínico de los productos corneales artificiales en un modelo animal. A: tras eliminar la hemicórnea anterior, la construcción corneal se colocó sobre la superficie del estroma; B: aspecto final una vez suturado; C: evolución a las 3 semanas; D: evolución a las 6 semanas.

50

**Figura 5.** Muestra la evaluación del producto de uretra humana artificial. A. Análisis microscópico. B. Análisis inmunohistoquímico (expresión de integrinas).

55

**Figura 6.** Muestra la evaluación del producto de vejiga urinaria artificial. A. Análisis microscópico: Vejiga humana artificial fabricada en laboratorio y mantenida en cultivo durante 1 y 3 semanas, respectivamente. B. Análisis inmunohistoquímico: Análisis mediante inmunofluorescencia de la vejiga artificial humana generada mediante ingeniería tisular y de la vejiga humana control normal para las citoqueratinas (CK) 7, 8, 4, 13 y pancitoqueratina.

60

**Figura 7.** Muestra la evaluación de los productos de mucosa oral humana artificial. A. Análisis mediante microscópico óptico de los tejidos de fibrina, agarosa y colágeno (este último a una concentración final de 2,8 g/l) teñidos con hematoxilina y eosina tras 1, 2, 3 y 4 semanas de desarrollo en cultivo y del estroma de la mucosa oral humana utilizada como control. B. Análisis mediante microscopio electrónico de barrido de los tejidos artificiales basados en fibrina, agarosa y colágeno con una concentración final preferida de colágeno de 2,8 g/l (A) en

65

comparación con los tejidos artificiales de fibrina, agarosa y colágeno con una concentración final de colágeno de 3,8 g/l (B), de fibrina, agarosa y colágeno con una concentración final de colágeno de 1,9 g/l (C), o de colágeno a una concentración final de 5,6 g/l en ausencia de fibrina y agarosa (D) y del estroma de la mucosa oral humana normal utilizada como control (E). C. Esfuerzo umbral de los tejidos artificiales basados en fibrina, agarosa y colágeno con una concentración final preferida de colágeno de 2,8 g/l (A) en comparación con los tejidos artificiales de fibrina, agarosa y colágeno con una concentración final de colágeno de 3,8 g/l (B), de fibrina, agarosa y colágeno con una concentración final de colágeno de 1,9 g/l (C), o de colágeno a una concentración final de 5,6 g/l en ausencia de fibrina y agarosa (D).

10 **Figura 8.** Muestra la mejora del esfuerzo umbral (en Pascales) de los tejidos nanoestructurados con respecto a los no nanoestructurados.

**Figura 9.** Muestra el módulo viscoso  $G''$  de las muestras sometidas a nanoestructuración y de las muestras no nanoestructuradas (datos en Pascales).

15 **Figura 10.** Muestra el modulo elástico  $G'$  de los tejidos nanoestructurados y de los biomateriales naturales no nanoestructurados.

20 **Figura 11.** Muestra la transparencia de los tejidos sometidos a nanoestructuración de fibrina-agarosa 0,1 %, y de los biomateriales no nanoestructurados de fibrina-agarosa 0,1 %. Los datos se dan como porcentaje de transmitancia del espectro de la luz visible (aproximadamente, de 400 a 700 nm).

### Descripción detallada de la invención

25 La ingeniería tisular es una de las áreas de la biotecnología que más se ha desarrollado en los últimos años, debido a su utilidad para la producción *in vitro* de tejidos y órganos para su implante en pacientes que necesitan estos tejidos. Sin embargo, las limitaciones de los tejidos artificiales hasta ahora existentes hacen necesario el desarrollo de nuevas técnicas que permitan la obtención de tejidos artificiales que puedan utilizarse en la práctica clínica humana o para la evaluación de productos farmacológicos y químicos.

#### 30 Método de la invención

La presente invención proporciona un método *in vitro* de preparación de un tejido artificial, el tejido artificial obtenible por dicho método y el uso de este tejido artificial para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano dañado.

35 Un primer aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* de preparación de un tejido artificial (de aquí en adelante, método de la invención) que comprende:

- 40 a) añadir una composición que comprende fibrinógeno a una muestra de células aisladas,
- b) añadir un agente antifibrinolítico al producto resultante de la etapa (a),
- c) añadir, al menos, un factor de coagulación, una fuente de calcio, trombina, o cualquier combinación de los anteriores, al producto resultante de la etapa (b),
- 45 d) añadir una composición de un polisacárido al producto resultante de la etapa (c),
- e) cultivar células aisladas en o sobre el producto resultante de la etapa (d), y
- f) inducir la nanoestructuración del producto resultante de la etapa (e), comprendiendo dicha inducción de nanoestructuración la deshidratación y/o compresión mecánica del producto resultante de la etapa (e), y siendo el polisacárido de la etapa (d) agarosa.

50 En la etapa (a) del método de la invención se añade una composición que comprende fibrinógeno a células aisladas, preferentemente, de un mamífero. Dichas células pueden obtenerse mediante diferentes métodos descritos en el estado de la técnica, que pueden depender del tipo celular particular relacionado. Algunos de estos métodos son, por ejemplo, pero sin limitarse, biopsia, procesado mecánico, tratamiento enzimático (por ejemplo, pero sin limitarse, tratamiento con tripsina o colagenasa de tipo I), centrifugación, lisis eritrocitaria, filtración, cultivo en soportes o medios que favorezcan la proliferación selectiva de dicho tipo celular o inmunocitometría. Algunos de estos métodos se describen en detalle en los ejemplos de esta memoria descriptiva.

60 Las células de la etapa (a) pueden ser células diferenciadas tal como, por ejemplo, pero sin limitarse, fibroblastos, queratocitos o células musculares lisas, o células no diferenciadas con la capacidad para diferenciarse en dichas células tales como, por ejemplo, células madre adultas.

65 En una realización preferida del método de la invención, las células de la etapa (a) son fibroblastos o células no diferenciadas con la capacidad para diferenciarse en fibroblastos. Los fibroblastos pueden obtenerse de cualquier tejido u órgano, sin embargo, preferentemente, los fibroblastos de la etapa (a) proceden del tejido o del órgano en el que va a utilizarse como sustituto el tejido artificial. Por ejemplo, cuando el método de la invención se utiliza para preparar un tejido sustituto de piel o una piel artificial, los fibroblastos proceden, preferentemente, de piel

- (fibroblastos dérmicos); cuando se utiliza para preparar un tejido sustituto de vejiga o una vejiga artificial, los fibroblastos proceden, preferentemente, de vejiga; cuando se utiliza para preparar un tejido sustituto de uretra o una uretra artificial los fibroblastos proceden, preferentemente, de uretra; o cuando se utiliza para preparar un tejido sustituto de mucosa oral o una mucosa oral artificial los fibroblastos proceden preferentemente, de mucosa oral. No obstante, los fibroblastos pueden obtenerse de cualquier otro tejido u órgano, tal como, por ejemplo, la mucosa oral, la pared abdominal o cualquier tejido conjuntivo. Por ejemplo, los fibroblastos obtenidos de mucosa oral pueden utilizarse para preparar un tejido sustituto de piel o una piel artificial, un tejido sustituto de vejiga o una vejiga artificial, un tejido sustituto de uretra o una uretra artificial, o un tejido sustituto de córnea o una córnea artificial.
- 5
- 10 En otra realización preferida del método de la invención, las células de la etapa (a) son queratocitos o células no diferenciadas con la capacidad para diferenciarse en queratocitos. Por ejemplo, cuando el método de la invención se utiliza para preparar un tejido sustituto de córnea o una córnea artificial, preferentemente, se utilizan queratocitos del estroma corneal.
- 15 La posibilidad de que todos los componentes del tejido artificial sean de origen autólogo permite que el trasplante de dicho tejido pueda realizarse sin que sea necesaria la inmunosupresión del sujeto trasplantado. Sin embargo, los componentes del tejido artificial también puedan ser de origen alogénico, es decir, pueden proceder de un individuo diferente a aquel al que se le va a trasplantar el tejido artificial. Incluso la especie de la cual proceden dichos componentes, puede ser diferente; en cuyo caso se dice que su origen es xenogénico. Esto abre la posibilidad de
- 20 que el tejido artificial esté preparado de antemano cuando se necesite con urgencia, aunque en este caso sí sería recomendable proceder a la inmunosupresión del sujeto al que se trasplante el tejido artificial.
- Por lo tanto, en una realización preferida, las células de la etapa (a) de la invención son de origen autólogo. No obstante, las células de la etapa (a) también pueden ser de origen alogénico o xenogénico.
- 25
- Mediante la adición a las células de la etapa (a) de los diferentes componentes descritos en las etapas (a)-(d) del método de la invención, y tras dejar reposar el producto resultante de la etapa (e) en un soporte, se produce la formación de una matriz que comprende fibrina, el polisacárido y, en el caso correspondiente, la proteína añadida en la etapa (d2) si se ha aplicado dicha etapa, en la que quedan embebidas dichas células y sobre la cual y/o en cuyo interior éstas pueden crecer. Preferentemente, las células de la etapa (a) crecen en el interior de dicha matriz.
- 30
- La formación de una matriz de fibrina tiene lugar por la polimerización del fibrinógeno inducida por trombina. El fibrinógeno es una proteína de elevado peso molecular que está presente en el plasma sanguíneo. La trombina es una enzima proteolítica que provoca la ruptura de la molécula de fibrinógeno en polipéptidos de bajo peso molecular y en monómeros de fibrina. Dichos monómeros polimerizan en dímeros y posteriormente se unen entre sí mediante enlaces covalentes por la acción del factor XIII, previamente activado por la trombina, y en presencia de iones de calcio.
- 35
- La composición que comprende fibrinógeno de la etapa (a) puede ser, por ejemplo, pero sin limitarse, plasma sanguíneo. La composición de la etapa (a) puede asimismo prepararse a partir de un derivado plasmático, tal como, por ejemplo, pero sin limitarse, un crioprecipitado o un concentrado de fibrinógeno. Además de fibrinógeno, la composición de la etapa (a) puede contener otros factores de coagulación.
- 40
- En una realización preferida, la concentración de fibrinógeno en el producto resultante de la etapa (c) es de entre 0,5 y 10 g/l, opcionalmente entre 1 y 10 g/l. En una realización más preferida, la concentración en el producto resultante de la etapa (d) es de entre 1 y 4 g/l, opcionalmente entre 2 y 4 g/l. No obstante, también podría utilizarse una concentración más alta o más baja.
- 45
- En una realización preferida, el fibrinógeno de la composición de la etapa (a) o la composición que comprende fibrinógeno de la etapa (a) es de origen autólogo. No obstante, el fibrinógeno de la composición de la etapa (a) o la composición que comprende fibrinógeno de la etapa (a) también puede ser de origen alogénico o xenogénico.
- 50
- En una realización preferida de este primer aspecto de la invención, la composición que contiene fibrinógeno de la etapa (a) es plasma sanguíneo. En este caso, la polimerización del fibrinógeno puede inducirse mediante la adición de una fuente de calcio en la etapa (c).
- 55
- En una realización más preferida de este primer aspecto de la invención, la fuente de calcio de la etapa (c) es una sal de calcio tal como, por ejemplo, pero sin limitarse, cloruro cálcico, gluconato cálcico o una combinación de ambas. La concentración de la sal de calcio deberá ser suficiente para inducir la polimerización del fibrinógeno. En una realización más preferida, la sal de calcio es cloruro cálcico. En una realización aún más preferida, la concentración de cloruro de calcio en el producto resultante de la etapa (e) es de entre 0,25 y 3 g/l, opcionalmente entre 0,5 y 4 g/l. No obstante, también podría utilizarse una concentración más alta o más baja.
- 60
- El término "factor de coagulación", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un componente, generalmente, una proteína, presente en el plasma sanguíneo y que interviene en la reacción en cadena que hace posible la coagulación. Son trece los factores de coagulación, nombrados con números romanos: I: fibrinógeno; II:
- 65

protrombina; III: factor tisular o tromboplastina; IV: calcio; V: proacelerina; VI: factor inactivo o cimógeno; VII: proconvertina; VIII: factor antihemofílico A o factor von Willebrand; IX: factor antihemofílico B o factor de Christmas; X: factor de Stuart-Prower; XI: factor antihemofílico C; XII: Factor Hageman; XIII: Factor estabilizante de la fibrina; XIV: Fitzgerald; XV: Fletcher; XVI: plaquetas y XVII: Somocurcio. Preferentemente, el otro factor de coagulación añadido en la etapa (c) del método de la presente invención es el factor XIII.

El polímero de fibrina puede degradarse mediante el proceso denominado fibrinólisis. Durante la fibrinólisis, el plasminógeno es convertido en la enzima activa plasmina, por el activador tisular del plasminógeno; la plasmina se une a la superficie de la fibrina a través de sus sitios de unión, para producir la degradación del polímero de fibrina. Para impedir la fibrinólisis de la matriz de fibrina, en la etapa (b) de la presente invención se añade un agente antifibrinolítico tal como, por ejemplo, pero sin limitarse, ácido épsilon aminocaproico, ácido tranexámico o aprotinina.

El ácido tranexámico es un producto sintético derivado del aminoácido lisina con gran afinidad por los sitios de unión de lisina del plasminógeno; bloquea estos sitios e impide la unión del plasminógeno activado a la superficie de fibrina, ejerciendo un efecto antifibrinolítico. El ácido tranexámico tiene la ventaja, frente a otros agentes antifibrinolíticos de origen animal, de que no transmite enfermedades. Por tanto, en una realización preferida, el agente antifibrinolítico es el ácido tranexámico. En una realización aún más preferida, la concentración de ácido tranexámico en el producto resultante de la etapa (e) es de entre 0,5 y 2 g/l, preferentemente entre 1 y 2 g/l. No obstante, también podría utilizarse una concentración más alta o más baja.

Las matrices de fibrina son muy versátiles, por lo que se han utilizado para la preparación de diferentes tejidos artificiales, sin embargo, la utilización clínica de las mismas se ha visto limitada debido al hecho, fundamentalmente, de su escasa consistencia, su difícil manipulación y su enorme fragilidad. Por ese motivo, en la etapa (d) del método de la invención se añade un polisacárido. En general, dicho polisacárido se utiliza para aportar resistencia y consistencia al tejido, y es conveniente que sea soluble en el mismo. Ejemplos de polisacáridos que pueden utilizarse en la etapa (d) del método de la presente invención son pero, sin limitarse, agar-agar, agarosa, alginato, quitosano o carragenanos, o cualquier combinación de los anteriores. El polisacárido añadido en la etapa (d) del método de la invención es agarosa.

La agarosa es un polisacárido formado por galactosas alfa y beta que se extrae de algas de géneros tales como *Gellidium* o *Gracillaria*. La agarosa, frente a otros polisacáridos que pueden utilizarse en la etapa (d) de la presente invención, tiene la ventaja de que forma una matriz inerte desde el punto de vista inmunológico. Por tanto, en una realización preferida, el polisacárido de la etapa (d) del método de la invención es agarosa. Existen diferentes tipos de agarosa que varían en sus propiedades físicas y químicas tales como, por ejemplo, la temperatura de gelificación, la resistencia y/o la porosidad del gel. Preferentemente, la agarosa de la etapa (d) del método de la invención es una agarosa con un punto de fusión bajo, es decir, una agarosa que se repolimeriza y solidifica a una temperatura, preferentemente, menor de 65 °C y, más preferentemente, menor de 40 °C; de esta manera puede utilizarse para preparar el tejido a temperaturas muy bajas, minimizando la probabilidad de muerte celular. En una realización más preferida, la agarosa utilizada en la etapa (d) del método de la invención es agarosa de tipo VII. En una realización aún más preferida, la agarosa, preferentemente, agarosa de tipo VII, en el producto resultante de la etapa (e) está a una concentración, ventajosamente, de entre 0,1 y 6 g/l, opcionalmente entre 0,2 y 6 g/l, preferentemente, de entre 0,15 y 3 g/l, opcionalmente entre 0,3 y 3 g/l y más preferentemente, de entre 0,25 y 2 g/l, opcionalmente entre 0,5 y 2 g/l. No obstante, también podría utilizarse una concentración más alta o más baja.

En una realización preferida, el método de la invención comprende una etapa adicional entre la etapa (b) y la (c) etapa (b2)) en el que se añade una proteína. Son ejemplos de proteínas que pueden utilizarse en la etapa (b2) del método de la presente invención pero sin limitarse, fibronectina, laminina, colágeno de tipo VII o entactina, o cualquier combinación de los anteriores. Estas proteínas forman parte de la matriz extracelular del tejido conjuntivo de manera natural en los tejidos, por lo que las células embebidas en un tejido artificial obtenido mediante el método de la invención, encuentran un microambiente más parecido al fisiológico, mejorando la adhesión, la diferenciación y/o la supervivencia de dichas células.

En una realización preferida, la proteína que se añade en la etapa (b2) es fibronectina. La fibronectina es una glicoproteína presente en la matriz extracelular (MEC) de la mayoría de los tejidos celulares animales desempeñando un importante papel en la adhesión de las células a la matriz. En una realización más preferida, la proteína añadida entre la etapa (b) y la (c) del método de la invención es fibronectina. El objeto de esta adición es favorecer la adhesión de las células de la etapa (e) al producto resultante de la etapa (d). Por ejemplo, cuando el método de la invención se utiliza para preparar un tejido sustituto de córnea o una córnea artificial, la adición de fibronectina minimiza el desprendimiento de las células del epitelio corneal añadidas en la etapa (e) lo que supone una importante ventaja con respecto a otros métodos descritos en el estado de la técnica. En una realización aún más preferida, la concentración de fibronectina en el producto resultante de la etapa (d) es de entre 0,25 y 1g/l, opcionalmente entre 0,5 y 1 g/l. No obstante, también podría utilizarse una concentración más alta o más baja.

En una realización preferida, el método de la invención comprende una etapa adicional (etapa d2) entre la etapas (d) y (e), que comprende la adición de una composición que comprende una proteína al producto resultante de la etapa

(d). Son ejemplos de proteínas que pueden utilizarse en la etapa (e) del método de la presente invención, pero sin limitarse, colágeno, reticulina o elastina. La adición de una proteína entre la etapa (d) y la (e) da lugar a tejidos que presentan una mayor densidad fibrilar a nivel del estroma, un mejor comportamiento viscoelástico y un esfuerzo umbral creciente. En una forma de realización aún más preferida, la proteína que se añade en la etapa (d2) es colágeno.

La adición de dichas proteínas en la etapa (d2) del método de la invención también mejora las propiedades físicas (reológicas, mecánicas o biomecánicas) del tejido artificial obtenido. En los ejemplos de esta memoria descriptiva se demuestra que en los tejidos artificiales que comprenden fibrina, agarosa y colágeno, el uso de concentraciones crecientes de colágeno mejora el comportamiento viscoelástico, lo que se pone de manifiesto por un aumento del esfuerzo umbral dependiente de la concentración de colágeno.

Las principales propiedades reológicas de un material sólido o semisólido son la viscosidad y la elasticidad. La viscosidad es la resistencia que ofrece un fluido a la deformación tangencial, y sería equivalente a la consistencia o rigidez. La elasticidad es la propiedad mecánica de ciertos materiales de sufrir deformaciones reversibles cuando se encuentran sujetos a la acción de fuerzas externas, y de recuperar la forma original cuando cesan estas fuerzas externas. El análisis de estos parámetros se realiza mediante reometría, técnica física que utiliza instrumentos denominados reómetros.

El esfuerzo umbral es la energía necesaria para provocar una deformación irreversible en un sólido o un fluido. Normalmente, todos los materiales tienen una región elástica, en la que la fuerza aplicada provoca una deformación totalmente reversible cuando cesa la fuerza. Si esa fuerza supera un límite (módulo elástico), la deformación pasa a ser irreversible, entrando en una región plástica. Finalmente, si la fuerza supera el módulo plástico, el material se rompe (punto de fractura).

El colágeno es una proteína de fácil disponibilidad en la naturaleza y desde el punto de vista biológico se caracteriza por su baja inmunidad y elevada actividad tisular. El colágeno forma las fibras de colágeno, que son flexibles, pero ofrecen gran resistencia a la tracción. En la presente invención se demuestra que los tejidos artificiales de fibrina, agarosa y colágeno tienen una mayor densidad fibrilar a nivel del estroma, un mejor comportamiento viscoelástico y un esfuerzo umbral creciente según se aumenta la concentración de colágeno, y más elevado que el de los tejidos artificiales de colágeno. Por tanto, en una realización preferida la proteína añadida en la etapa (e) es colágeno.

En una realización preferida, el colágeno añadido en la etapa (d2) se selecciona de la lista que comprende: colágeno de tipo I, colágeno de tipo II, colágeno de tipo III, colágeno de tipo IV, colágeno de tipo V, colágeno de tipo VI, colágeno de tipo VII, colágeno de tipo VIII, colágeno de tipo IX, colágeno de tipo X, colágeno de tipo XI, colágeno de tipo XII, colágeno de tipo XIII o cualquier combinación de los anteriores. En una realización más preferida, el colágeno añadido en la etapa (e) se selecciona de la lista que comprende: colágeno de tipo I, colágeno de tipo II, colágeno de tipo III, colágeno de tipo IV, colágeno de tipo V, colágeno de tipo IX o cualquier combinación de los anteriores. La selección de un tipo particular de colágeno en la etapa (e) del método de la invención, depende del tejido artificial que se desee preparar y se realiza en función de las características de cada colágeno que son conocidas en el estado de la técnica.

Por ejemplo, la función principal del colágeno de tipo I es la de resistencia al estiramiento, y se encuentra abundantemente en la dermis, el hueso, el tendón y la córnea. Así, en la presente invención se demuestra que la adición de colágeno de tipo I en la etapa (e) otorga excelentes propiedades al tejido artificial cuando se quiere preparar, por ejemplo, pero sin limitación, un tejido sustituto de córnea o una córnea artificial. Por tanto, en una realización preferida el colágeno es colágeno de tipo I.

En una realización aún más preferida, el colágeno, preferentemente, colágeno de tipo I, en el producto resultante de la etapa (d), está a una concentración, ventajosamente, de entre 0,5 y 5 g/l, preferentemente, de entre 1,8 y 3,7 g/l, y más preferentemente, de entre 2,5 y 3 g/l. No obstante, también podría utilizarse una concentración más alta o más baja.

En una realización particular, el colágeno utilizado es un atelocolágeno, es decir, un colágeno del cual se han eliminado las regiones terminales de estructura no helicoidal denominadas telopéptidos. Estos telopéptidos pueden hacer que el colágeno que sea insoluble y son portadores de los principales determinantes antigénicos del colágeno. El atelocolágeno se obtiene, por ejemplo, mediante tratamiento proteásico con pepsina.

Dependiendo de las concentraciones de fibrinógeno que se utilicen en la etapa (a), de la concentración de polisacárido que se utilice en la etapa (d) y, en el caso de que se aplique una etapa (d2), de la concentración de colágeno que se utilice en la etapa (d2), el tejido artificial resultante de la etapa (e) puede comprender concentraciones variables de dos/tres componentes.

En una realización preferida, en el producto resultante de la etapa (e), la concentración de fibrinógeno es de entre 0,5 y 10 g/l, la concentración de agarosa, preferentemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,1 y 6 g/l. Si se ha incluido una etapa (d2), la concentración del colágeno, preferentemente, colágeno de tipo I, es de entre 0,5 y 5 g/l.



una etapa (d2), la concentración del colágeno, preferentemente, colágeno de tipo I, es de entre 2,5 y 3 g/l.

Mediante la adición a las células de los diferentes componentes descritos en la etapa (a), una vez realizadas las etapas (a)-(d) del método de la invención, y tras dejar reposar el producto resultante de la etapa (e) en un soporte, se produce la formación de una matriz que comprende fibrina, el polisacárido y, en el caso de que se haya incluido la etapa (d2), la proteína añadida en dicha etapa, en la que quedan embebidas dichas células y sobre la cual y/o en cuyo interior éstas pueden crecer. Preferentemente, las células de la etapa (a) crecen en el interior de dicha matriz.

Una vez realizadas las etapas (a)-(d) del método de la invención, el producto resultante de la etapa (d) se deja reposar en un soporte para que se produzca la formación de la matriz que comprende la fibrina, el polisacárido y, dependiendo de si se ha llevado a cabo una etapa (b2), la proteína añadida en dicha etapa, en la que quedan embebidas las células de la etapa (a). Soportes que pueden utilizarse son, por ejemplo, pero sin limitarse, placas de cultivo tisular o insertos porosos de cultivo celular. Preferentemente, dichos soportes estarán en condiciones de esterilidad.

La etapa (e) del método de la invención, consiste en cultivar células aisladas, preferentemente, de un mamífero, en o sobre el producto resultante de la etapa (e). Dichas células pueden obtenerse mediante diferentes métodos descritos en el estado de la técnica y que pueden depender del tipo celular particular del que se trate. Algunos de estos métodos son, por ejemplo, pero sin limitarse, biopsia, procesado mecánico, tratamiento enzimático (por ejemplo, pero sin limitarse, con tripsina o colagenasa de tipo I), centrifugación, lisis eritrocitaria, filtración, cultivo en soportes o medios que favorezcan la proliferación selectiva de dicho tipo celular o inmunocitometría. Algunos de estos métodos se describen en detalle en los ejemplos de esta invención.

Las células de la etapa (e) pueden ser células diferenciadas, tales como, por ejemplo, pero sin limitarse, células epiteliales, o células no diferenciadas con la capacidad para diferenciarse en dichas células, tales como, por ejemplo, células madre adultas.

En una realización preferida, las células diferenciadas de la etapa (e) son células epiteliales, tales como, por ejemplo, pero sin limitarse, queratinocitos, células epiteliales de la mucosa oral, células epiteliales de la vejiga, células epiteliales de la uretra, células epiteliales de la córnea o células endoteliales vasculares.

Preferentemente, las células epiteliales de la etapa (e) proceden del tejido o del órgano en el que va a utilizarse como sustituto el tejido artificial. Por ejemplo, cuando el método de la invención se utiliza para preparar un tejido sustituto de piel o una piel artificial, las células epiteliales proceden, preferentemente, de la epidermis de la piel, es decir, son queratinocitos; cuando se utiliza para preparar un tejido sustituto de vejiga o una vejiga artificial, las células epiteliales proceden, preferentemente, del epitelio o urotelio de la vejiga; cuando se utiliza para preparar un tejido sustituto de uretra o una uretra artificial las células epiteliales proceden, preferentemente, del epitelio de la uretra; cuando se utiliza para preparar un tejido sustituto de córnea o una córnea artificial, preferentemente, las células epiteliales son células epiteliales de la córnea; cuando se utiliza para preparar un tejido sustituto de mucosa oral, preferentemente, las células epiteliales proceden, preferentemente, del epitelio de la mucosa oral.

Sin embargo, las células epiteliales de la etapa (e) también pueden obtenerse de un tejido u órgano distinto del tejido u órgano en el que va a utilizarse como sustituto el tejido artificial. Por ejemplo, cuando el método de la invención se utiliza para preparar un tejido sustituto de piel o una piel artificial, un tejido sustituto de vejiga o una vejiga artificial, un tejido sustituto de uretra o una uretra artificial, o un tejido sustituto de córnea o una córnea artificial, las células epiteliales de la etapa (e) pueden ser células epiteliales de la mucosa oral. O, por ejemplo, cuando el método de la invención se utiliza para preparar un tejido sustituto de vejiga o una vejiga artificial, o cuando se utiliza para preparar un tejido sustituto de uretra o una uretra artificial, las células epiteliales pueden ser queratinocitos.

Uno de los problemas que se asocian a la generación de tejido artificial en laboratorio, es la producción de un número significativo de células diferenciadas, por lo que con frecuencia, se considera como una fuente alternativa el uso de células madre, con capacidad para diferenciarse a dichas células. Se entiende por "célula madre" aquella que tiene una elevada capacidad para dividirse y diferenciarse morfológica y funcionalmente en distintos tipos de células más especializadas. Durante el proceso de diferenciación, una célula indiferenciada modifica su fenotipo y morfología para convertirse en una célula diferenciada, con una estructura y función especializada.

Según su potencialidad, es decir, a su capacidad para diferenciarse en distintos tipos celulares, las células madre se pueden clasificar en: (a) totipotentes (no forman parte de la invención): capaces de diferenciarse tanto en tejido embrionario como en tejido extraembrionario; (b) pluripotentes con capacidad para diferenciarse en cualquiera de los tejidos procedentes de las tres capas embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo); (c) multipotentes: capaces de diferenciarse en distintos tipos celulares derivados de una misma capa embrionaria (endodermo, mesodermo o ectodermo); y (d) unipotentes: con capacidad para formar un único linaje celular.

Según su origen, las células madre se han dividido en: (a) embrionarias: de la masa celular interna del blastocisto en el estadio embrionario de preimplantación o de la cresta gonadal, y que son totipotentes (no parte de la invención) o pluripotentes; y (b) adultas: en el adulto, el feto y el cordón umbilical, y que son multipotentes o unipotentes. Dentro

de las células madre adultas, nos encontramos con las células madre mesenquimáticas, que se encuentran repartidas en el tejido conectivo de diversos órganos, tales como, por ejemplo, pero sin limitarse, la médula ósea, la sangre periférica, el tejido adiposo o el cordón umbilical. En una realización preferida, las células madre adultas son células madre adultas de la médula ósea, del tejido adiposo o del cordón umbilical.

5 El cordón umbilical constituye una interesante fuente de células madre adultas, debido a que, a diferencia de las células madre adultas obtenidas de otras fuentes; (a) su método de obtención no es invasivo ni doloroso; y (b) su capacidad proliferativa y su potencial de diferenciación no disminuye como consecuencia del proceso de envejecimiento. Entre las diferentes fuentes de células madre del cordón umbilical destacan las llamadas células madre de la gelatina de Wharton del cordón umbilical, por: (a) su gran capacidad de proliferación y a su rapidez de expansión en cultivo; y (b) la baja expresión del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I y ausencia de expresión del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II, lo que las convierte en buenas candidatas para la terapia celular alogénica.

15 Por tanto, en otra realización preferida, las células de la etapa (e) son células madre de la gelatina de Wharton del cordón umbilical. Estas células expresan, en su superficie, diversos marcadores característicos de las células mesenquimáticas, tales como, por ejemplo, SH2, SH3, CD10, CD13, CD29, CD44, CD54, CD73, CD90, CD105 o CD166, y no tienen marcadores de linaje hematopoyético, tales como, por ejemplo, CD31, CD34, CD38, CD40 o CD45. Las células madre de la gelatina de Wharton del cordón umbilical pueden diferenciarse, por ejemplo, en condroblastos, osteoblastos, adipocitos, precursores neuronales, cardiomiocitos, células del músculo esquelético, células endoteliales o hepatocitos.

25 Las células madre adultas pueden caracterizarse mediante la identificación de proteínas de superficie y/o intracelulares, genes, y/u otros marcadores indicativos de su estado indiferenciado, mediante diferentes métodos conocidos en el estado de la técnica tales como, por ejemplo, pero sin limitarse, inmunocitometría, análisis inmunocitoquímico, análisis por transferencia Northern, RT-PCR, análisis de expresión génica en micromatrices, estudios proteómicos o análisis por presentación diferencial.

30 Las células madre pueden inducirse para diferenciarse *in vitro* para dar lugar a células que expresen, al menos, una o más características propias de células diferenciadas. Son ejemplos de células diferenciadas que pueden diferenciarse de las células madre, pero sin limitarse, los fibroblastos, los queratinocitos, las células uroteliales, las células del epitelio de la uretra, las células del epitelio corneal, las células epiteliales de la mucosa oral, los condroblastos, osteoblastos, adipocitos o las neuronas. En una realización preferida de la invención, la célula diferenciada de la célula madre multipotente de la invención expresa una o más características propias de una célula diferenciada seleccionada de la lista que comprende: fibroblasto, queratinocito, célula urotelial, célula del epitelio de la uretra, célula del epitelio corneal, célula epitelial de la mucosa oral, condroblasto, osteoblasto, adipocito o neurona.

40 Las células diferenciadas pueden caracterizarse mediante la identificación de proteínas de superficie y/o intracelulares, genes, y/u otros marcadores indicativos de su estado diferenciado, mediante diferentes métodos conocidos en el estado de la técnica tales como, por ejemplo, pero sin limitarse, inmunocitometría, análisis inmunocitoquímico, análisis por transferencia Northern, RT-PCR, análisis de expresión génica en micromatrices, estudios proteómicos o análisis por presentación diferencial.

45 En una realización preferida, las células de la etapa (e) de la invención son de origen autólogo. No obstante, las células de la etapa (e) también pueden ser de origen alogénico o xenogénico.

50 Las células de la etapa (e) son capaces de proliferar sobre el producto resultante de la etapa (d) y/o en su interior. Preferentemente, las células de la etapa (e) proliferan sobre la superficie del producto resultante de la etapa (d).

55 Las células de la etapa (e) se dejan proliferar hasta que alcanzan un número adecuado hasta que alcanzan, típicamente, al menos, un 70 % de confluencia, ventajosamente, al menos, un 80 % de confluencia, preferentemente, al menos, un 90 % de confluencia, más preferentemente, al menos, un 95 % de confluencia y, aún más preferentemente, al menos, un 100 % de confluencia. Durante el tiempo que las células se mantienen en cultivo, el medio de cultivo en el que se encuentran puede reemplazarse parcial o totalmente por un medio nuevo para reemplazar ingredientes agotados y eliminar metabolitos y catabolitos potencialmente dañinos.

60 Para la correcta diferenciación de algunos tipos celulares, puede ser necesaria una etapa adicional. Por ejemplo, en el caso de células epiteliales de la mucosa oral, queratinocitos o células del epitelio corneal, puede ser necesario exponer al aire la superficie epitelial para promover la correcta estratificación y maduración del epitelio, manteniendo la matriz que comprende las células de la etapa (a), sumergida en el medio de cultivo (técnica de aire y líquido).

65 Por tanto, en una realización preferida, el método de la invención, además de las etapas (a)-(f) descritas anteriormente, comprende una etapa adicional en la que el producto resultante de la etapa (e) se expone al aire. En general, el método de la invención incluye generalmente esta etapa cuando se utiliza para obtener un tejido artificial que sirva para reemplazar a un tejido natural cuyo epitelio se encuentra normalmente expuesto al contacto con el

aire, tal como, por ejemplo, pero sin limitarse, la piel, la córnea, la mucosa oral, la uretra o la vagina. Preferentemente, esta etapa se realiza cuando se prepara un tejido sustituto de piel o una piel artificial, o cuando se prepara un tejido sustituto de córnea o una córnea artificial, o cuando se prepara un tejido sustituto de mucosa oral o una mucosa oral artificial.

5 Una de las innovaciones más importantes del método de la invención, consiste en la existencia de una etapa (f) en la que se induce la nanoestructuración del producto resultante de la etapa (e). La expresión "nanoestructuración", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una modificación estructural que consiste en la generación de enlaces de tamaño inferior a un micrómetro entre las fibras de fibrina y entre éstas y las moléculas de agarosa. Este proceso de nanoestructuración permite obtener tejidos artificiales que muestran propiedades inesperadamente ventajosas con respecto a los biomateriales no estructurados. En concreto, los biomateriales sometidos a un proceso de nanoestructuración según la presente invención, presentan (i) una mejora significativa de las propiedades biomecánicas del tejido, lo que permite la manipulación del tejido nanoestructurado y supone una mejora sustancial e inesperada de las propiedades reológicas del biomaterial, caracterizada como una mayor resistencia (véase la figura 8) y una mayor elasticidad (véanse las figuras 9 y 10); (ii) una mejora sustancial de la manipulabilidad del tejido nanoestructurado, lo cual permitió su manipulación quirúrgica, la sutura en el lecho receptor y el implante en animales de experimentación, (iii) una mejora significativa de la transparencia de los tejidos sometidos a nanoestructuración (véase la figura 11), lo que no es en absoluto previsible puesto que los tejidos nanoestructurados son más densos y con menor contenido acuoso que los tejidos no nanoestructurados y (iv) un mejor resultado clínico una vez implantados en animales de laboratorio relacionados, por un lado, debido a la mayor eficacia del implante clínico gracias a las adecuadas propiedades biomecánicas del biomaterial y, por otro lado, al hecho de que los biomateriales sometidos a nanoestructuración tienen una mayor densidad de fibras por  $\text{mm}^2$  y, por tanto, una remodelación más lenta por parte del organismo receptor.

25 Según la invención, la inducción de la nanoestructuración de la etapa (f) comprende la deshidratación y/o la compresión mecánica del producto resultante de la etapa (e). El objetivo de la etapa (f) es generar una modificación estructural entre las fibras de fibrina y las moléculas de agarosa del tejido artificial para alcanzar niveles óptimos de consistencia y elasticidad, que no se obtienen mediante otros métodos descritos en el estado de la técnica. El resultado final es una modificación irreversible de las fibras que genera cualidades biomecánicas muy favorables para la manipulación quirúrgica y el implante clínico.

30 El término "deshidratación" se refiere a una eliminación parcial y/o total de líquido intersticial del producto resultante de la etapa (e). Por ejemplo, la cantidad de líquido intersticial eliminado del producto resultante de la etapa (e) puede ser de, al menos, un 50 %, al menos, un 60 %, al menos, un 70 %, al menos, un 80 %, al menos, un 90 % o, al menos, un 99 % de líquido intersticial contenido originalmente en el producto resultante de la etapa (e).

40 La deshidratación del producto resultante de la etapa (e) puede conseguirse por medio de cualquier método físico o químico. En una realización preferida, la deshidratación del producto resultante de la etapa (e) comprende un método seleccionado de la lista que comprende: drenaje, evaporación, succión, presión capilar, ósmosis o electroósmosis.

El líquido intersticial puede eliminarse inclinando el producto resultante de la etapa (e); el líquido intersticial se drena después debido al efecto de la gravedad y el gradiente.

45 El líquido puede eliminarse mediante succión, por ejemplo, aplicando vacío mediante una bomba mecánica a la superficie donde se encuentra el producto resultante de la etapa (e).

50 El líquido intersticial puede eliminarse mediante evaporación, por ejemplo, incubando el producto resultante de la etapa (e) en condiciones que promueven la evaporación, por ejemplo, a una presión menor que la presión atmosférica y/o a una temperatura mayor que la temperatura ambiente.

55 El líquido intersticial también puede eliminarse utilizando un agente osmótico con tendencia a absorber agua, tal como, por ejemplo, pero sin limitarse, una solución de cloruro sódico hiperosmótica, separando al producto resultante de la etapa (e) de esta solución mediante una membrana semipermeable, una esponja u otro material secante.

60 En una realización preferida, el líquido intersticial puede eliminarse mediante presión capilar, por ejemplo, mediante la aplicación de un material absorbente al producto resultante de la etapa (e). Algunos ejemplos de material absorbente que podrían utilizarse en la etapa (f) de la invención, pero sin limitarse, son papel de filtro, papel 3M de la casa comercial Whatman, fibra de celulosa o tela absorbente. Preferentemente, el material absorbente estará esterilizado.

65 El tiempo requerido para la deshidratación dependerá del método o métodos utilizados, y puede determinarlo con facilidad un experto en la materia. La idoneidad del tejido artificial obtenido mediante la aplicación de un determinado método de deshidratación durante un determinado periodo de tiempo puede comprobarse mediante diversos métodos de evaluación conocidos en el estado de la técnica tales como, por ejemplo, pero sin limitarse, los descritos

en los ejemplos de esta memoria descriptiva.

El líquido intersticial también puede eliminarse mediante compresión mecánica del producto resultante de la etapa (e). La compresión mecánica del producto resultante de la etapa (e) además puede servir para dar al producto resultante de la etapa (e) una forma definida deseada.

La compresión del producto resultante de la etapa (e) puede realizarse mediante cualquier método descrito en el estado de la técnica. Puede utilizarse un método de compresión "estático", donde el producto resultante de la etapa (e) permanece estacionario tal como, por ejemplo, pero sin limitarse, la aplicación de una carga estática (por ejemplo, un peso muerto), un elemento hidráulico o una leva. También puede utilizarse un método de compresión "dinámica", donde el producto resultante de la etapa (e) se mueve durante la compresión tal como, por ejemplo, mediante la aplicación de uno o más rodillos o mediante la extrusión a través de un orificio constrictivo.

La compresión mecánica del producto resultante de la etapa (e) puede realizarse mediante extrusión, por ejemplo, haciendo pasar el producto resultante de la etapa (e) a través de un orificio que lo constriña, por ejemplo, una cámara cónica. La cámara cónica puede tener paredes porosas, de manera que permitiría la eliminación del líquido intersticial del producto resultante de la etapa (e) mientras éste pasa a través de la misma.

La compresión del producto resultante de la etapa (e) puede realizarse mediante la centrifugación del producto resultante de la etapa (e). Por ejemplo, el producto resultante de la etapa (e) puede colocarse sobre un tubo con el fondo poroso, de manera que, además de la compresión mecánica, se produciría la eliminación del líquido intersticial del producto resultante de la etapa (e).

La compresión del producto resultante de la etapa (e) puede realizarse mediante la aplicación de un globo en su interior para comprimir el producto resultante de la etapa (e) contra una superficie sólida. La superficie sólida puede formar, por ejemplo, un tubo alrededor del producto resultante de la etapa (e), permitiendo la formación de un tejido artificial tubular.

En una realización preferida, la compresión del producto resultante de la etapa (e) comprende la aplicación de un peso encima del producto resultante de la etapa (e), de manera que se ejerce una acción mecánica de presión sobre el tejido. Resulta evidente que cuanto mayor sea el peso, menor será el tiempo necesario para obtener un tejido artificial con las características apropiadas. El peso utilizado para la compresión puede tener una superficie plana o puede colocarse sobre un material que tenga una superficie plana, por ejemplo, plástico, cerámica, metal o madera.

En la figura 1 de la presente memoria descriptiva se muestra un esquema no limitativo de cómo puede realizarse la nanoestructuración del producto resultante de la etapa (e) mediante su deshidratación y compresión. En dicho esquema puede observarse como puede obtenerse la nanoestructuración situando el producto resultante de la etapa (e) entre dos papeles de filtro estéril, y colocando sobre el mismo un peso de aproximadamente 250 g (equivalente a aproximadamente 2.000 N/m<sup>2</sup>) sobre una superficie plana de vidrio estéril durante aproximadamente 10 minutos; entre el tejido y el papel de filtro sobre el que se coloca el peso se puede disponer un material poroso para impedir que el producto resultante de la etapa (e) se adhiera al papel de filtro. El material utilizado para impedir la adherencia debe ser poroso para permitir la salida de agua desde el tejido hacia el agente deshidratante: dicho material poroso utilizado para impedir la adherencia puede ser, por ejemplo, pero sin limitarse, nylon, vidrio, cerámica, metal perforado o una membrana de policarbonato.

En una realización preferida, la compresión del producto resultante de la etapa (e) comprende la aplicación de una presión sobre el mismo. Preferentemente, la magnitud de la presión es de entre 1.000 y 5.000 N/m<sup>2</sup>, más preferentemente, de entre 1.500 y 2.500 N/m<sup>2</sup> y, aún más preferentemente, de aproximadamente 2.000 N/m<sup>2</sup>. La aplicación de dicha presión puede hacerse manual, automática o semi-automáticamente. El tiempo que se necesita para ejercer la presión depende de la magnitud de la presión aplicada y puede determinarlo con facilidad un experto en la materia. Resulta evidente que cuanto mayor sea la presión menor será el tiempo necesario para obtener un tejido artificial con las características apropiadas. La idoneidad del tejido artificial obtenido mediante la aplicación de una determinada magnitud de presión durante un determinado periodo de tiempo, puede comprobarse mediante diversos métodos de evaluación conocidos en el estado de la técnica, tales como, por ejemplo, pero sin limitarse, los descritos en los ejemplos de esta memoria descriptiva.

Para inducir la nanoestructuración del producto resultante de la etapa (e) pueden utilizarse uno o más procedimientos, de manera secuencial o simultánea. El tiempo requerido para la nanoestructuración puede ser menor de 12 horas, menor de 6 horas, menor de 3 horas, menor de 1 hora, menor de 30 minutos, menor de 10 minutos, menor de 2 minutos o menor de 1 minuto. El tiempo requerido para la nanoestructuración dependerá del método o métodos utilizados, y puede determinarlo con facilidad un experto en la materia. La idoneidad del tejido artificial obtenido mediante la aplicación de un determinado método durante un determinado periodo de tiempo, puede comprobarse mediante diversos métodos de evaluación conocidos en el estado de la técnica, tales como, por ejemplo, pero sin limitarse, los descritos en los ejemplos de esta memoria descriptiva.

Tejido artificial de la invención

Un segundo aspecto de la presente invención, se refiere a un tejido artificial obtenible por el método de la invención anteriormente descrito (de ahora en adelante, tejido artificial de la invención).

5 En una realización preferida de este segundo aspecto de la invención, el tejido artificial de la invención es un tejido sustituto de piel o una piel artificial.

10 En otra realización preferida de este segundo aspecto de la invención, el tejido artificial es un tejido sustituto de vejiga o una vejiga artificial.

En otra realización preferida de este segundo aspecto de la invención, el tejido artificial de la invención es un tejido sustituto de uretra o una uretra artificial.

15 En otra realización preferida de este segundo aspecto de la invención, el tejido artificial de la invención es un tejido sustituto de córnea o una córnea artificial.

En otra realización preferida de este segundo aspecto de la invención, el tejido artificial de la invención es un tejido sustituto de mucosa o una mucosa artificial.

20 El tejido artificial obtenible por el método de la invención se puede cortar en el tamaño deseado y/o disponer en una conformación adecuada para su uso.

25 Antes de su uso, puede evaluarse la idoneidad del tejido artificial de la invención para ejercer su función, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante cualquiera de los métodos descritos en los ejemplos de la presente descripción.

Usos del tejido artificial de la invención en la evaluación de productos farmacológicos o químicos

30 Los fármacos y productos químicos deben evaluarse antes de su administración en animales de experimentación. A este respecto, son varios los informes y directivas aprobados por la Unión Europea que tratan de restringir o incluso prohibir la experimentación con animales en el sector de los productos cosméticos (Directiva 76/768/CEE del Consejo Europeo relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados Miembros en materia de productos cosméticos), y es de esperar que la prohibición total sea efectiva durante los próximos años. La Unión Europea  
35 apoya todas las medidas cuyo objetivo principal sea el bienestar de los animales utilizados con fines experimentales y para lograr métodos científicos de sustitución para reducir al mínimo el número de animales utilizados en experimentación (Decisión 1999/575/CE del Consejo, de 23 de marzo de 1998, relativa a la celebración por la Comunidad del Convenio Europeo sobre la protección de animales vertebrados utilizados para experimentación y otros fines científicos - Diario Oficial L 222 de 24.08.1999).

40 Por tanto, un tercer aspecto de la invención se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la evaluación de un producto farmacológico y/o químico.

Usos terapéuticos de los tejidos artificiales de la invención

45 Una enfermedad infecciosa, inflamatoria, genética o degenerativa, un daño físico o químico, o una interrupción del flujo sanguíneo, pueden dar lugar a una pérdida de células de un tejido o un órgano. Esta pérdida celular conllevaría una alteración de la función normal de dicho tejido u órgano; y por consiguiente, conduciría al desarrollo de enfermedades o secuelas físicas que merman la calidad de vida de la persona. Por tanto, es importante tratar de regenerar o y restablecer la función normal de dichos tejidos u órganos. El tejido o el órgano dañado pueden  
50 sustituirse por un tejido u órgano nuevo que se haya fabricado en el laboratorio mediante técnicas de ingeniería tisular. El objetivo de la ingeniería tisular es la construcción de tejidos biológicos artificiales y la utilización de los mismos con fines médicos para restaurar, sustituir o incrementar las actividades funcionales de los tejidos y órganos enfermos. El uso terapéutico de este tipo de técnicas es prácticamente ilimitado con aplicaciones en todos los campos. El uso de las técnicas de ingeniería tisular permite disminuir las listas de espera de tejidos y órganos, con la consiguiente disminución de la morbimortalidad de la enfermedad en el receptor. Lógicamente, también tiene como consecuencia una disminución de la morbimortalidad en los donantes de órganos. Por otra parte, existen numerosas ventajas asociadas a la utilización de células o tejidos autólogos en la ingeniería tisular, entre las que se incluyen: (a) una reducción significativa del número de infecciones del donante al receptor por agentes infecciosos; y (b) la  
55 ausencia de rechazo inmune de injerto contra huésped, por lo que el paciente no tiene necesidad de tomar tratamiento inmunosupresor, evitándose los efectos secundarios y los problemas asociados a la inmunodepresión.

60 Por tanto, un cuarto aspecto de la invención se refiere al uso del tejido artificial de la invención para su uso incrementando, restaurando o sustituyendo, parcial o totalmente, la actividad funcional de un tejido o un órgano enfermo o dañado.

El tejido artificial de la invención puede utilizarse para incrementar, restaurar o sustituir, parcial o totalmente, la actividad funcional de cualquier tejido u órgano enfermo o dañado de un organismo vivo. El tejido o el órgano pueden ser internos, tal como, por ejemplo, pero sin limitarse, la uretra o la vejiga, o externos, tal como, por ejemplo, pero sin limitarse, la córnea o la piel. En una realización preferida, el tejido o el órgano dañado se seleccionan de la lista que comprende: piel, vejiga, uretra, córnea, mucosa, conjuntiva, pared abdominal, conjuntiva, tímpano, faringe, laringe, intestino, peritoneo, ligamento, tendón, hueso, meninge o vagina. El tejido o el órgano pueden estar enfermos o dañados como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad, por ejemplo, pero sin limitarse, una enfermedad infecciosa, inflamatoria, genética o degenerativa; un daño físico, tal como un traumatismo o una intervención quirúrgica, un daño químico o una interrupción del flujo sanguíneo.

Una realización preferida de este quinto aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir, parcial o totalmente, la actividad funcional de una piel. Una realización más preferida se refiere al uso del tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir, parcial o totalmente, la actividad funcional de una piel enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una herida, una úlcera, una quemadura, una neoplasia benigna o maligna, una infección, una contusión, un traumatismo, una causticación o una malformación congénita.

Una realización preferida de este quinto aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir, parcial o totalmente, la actividad funcional de una vejiga. Una realización más preferida se refiere al uso del tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir, parcial o totalmente, la actividad funcional de una vejiga enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una neoplasia benigna o maligna, una infección, un traumatismo, una malformación congénita (tal como, por ejemplo, pero sin limitarse, extrofia vesical, vejiga contraída o extrofia de cloaca), una vejiga neurógena, incontinencia urinaria, una disfunción vesical, una infección o una litiasis vesical.

Una realización preferida de este quinto aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir, parcial o totalmente, la actividad funcional de una uretra. Una realización más preferida se refiere al uso del tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir, parcial o totalmente, la actividad funcional de una uretra enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una neoplasia benigna o maligna, una infección, un traumatismo, una malformación congénita (tal como, por ejemplo, pero sin limitarse, hispospadias o epispadias) o una estenosis.

Una realización preferida de este quinto aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir, parcial o totalmente, la actividad funcional de una córnea. Una realización más preferida se refiere al uso del tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir, parcial o totalmente, la actividad funcional de una córnea enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una úlcera corneal, un queratocono, un queratogloblo, un descematocele, un traumatismo, una causticación, una insuficiencia límbica, una queratitis atrófica, una distrofia corneal, una queratopatía primaria o secundaria, una infección, un leucoma, una queratopatía bullosa, un insuficiencia endotelial corneal o una neoplasia benigna o maligna.

Una realización preferida de este quinto aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la preparación de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir, parcial o totalmente, la actividad funcional de una mucosa, preferentemente de una mucosa oral. Una realización aún más preferida se refiere al uso del tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir, parcial o totalmente, la actividad funcional de una mucosa oral enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una herida, una úlcera, una quemadura, una neoplasia benigna o maligna, una infección, una contusión, un traumatismo, una causticación, una malformación congénita, una pérdida de sustancia o una enfermedad periodontal. En una realización preferida, el tejido que se utiliza para incrementar, restaurar o sustituir, parcial o totalmente, la actividad funcional de una mucosa es un tejido que entre la etapa (d) y la etapa (e) se ha sometido a una etapa (d2) de adición de una proteína. En una realización aún más preferida, dicha etapa se lleva a cabo añadiendo, al material obtenido en la etapa (d), una composición que comprende colágeno, tal y como se describió en detalle anteriormente.

Un quinto aspecto de la presente invención se refiere al uso del tejido artificial de la invención en la preparación de un medicamento.

Dicho medicamento es un medicamento de terapia celular somática. Por "terapia celular somática" se entiende el uso de células somáticas vivas, autólogas, alogénicas o xenogénicas, cuyas características biológicas se han alterado sustancialmente como resultado de su manipulación para obtener un efecto terapéutico, de diagnóstico o preventivo, por medios metabólicos, farmacológicos o inmunológicos. Entre los medicamentos de terapia celular somática se encuentran, por ejemplo, pero sin limitarse: células manipuladas para modificar sus propiedades inmunológicas, metabólicas o funcionales de otro tipo en aspectos cualitativos o cuantitativos; células clasificadas, seleccionadas y manipuladas, que se someten posteriormente a un proceso de fabricación con el fin de obtener el producto final; células manipuladas y combinadas con componentes no celulares (por ejemplo, matrices o

dispositivos médicos biológicos o inertes) que ejercen la acción pretendida en principio en el producto acabado; derivados de células autólogas expresadas *ex vivo* (*in vitro*) en condiciones específicas de cultivo; células modificadas genéticamente o sometidas a otro tipo de manipulación para expresar propiedades funcionales homólogas o no homólogas no expresadas anteriormente.

5 Un quinto aspecto de la presente invención se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la preparación de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir, parcial o totalmente, la actividad funcional de un tejido o un órgano. En una realización preferida, el tejido o el órgano dañado se seleccionan de la lista que comprende: piel, vejiga, uretra, córnea, mucosa, conjuntiva, pared abdominal, conjuntiva, tímpano, faringe, laringe, intestino, peritoneo, ligamento, tendón, hueso, meninge o vagina.

10 Una realización preferida de este quinto aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la preparación de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir, parcial o totalmente, la actividad funcional de un tejido o un órgano enfermo o dañado como consecuencia de una enfermedad infecciosa, inflamatoria, genética o degenerativa, un daño físico o químico o una interrupción del flujo sanguíneo.

15 Una realización más preferida de este quinto aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la preparación de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir, parcial o totalmente, la actividad funcional de una piel. Una realización aún más preferida se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la preparación de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir, parcial o totalmente, la actividad funcional de una piel enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una herida, una úlcera, una quemadura, una neoplasia benigna o maligna, una infección, una contusión, un traumatismo, una causticación o una malformación congénita.

20 Una realización más preferida de este quinto aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la preparación de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir, parcial o totalmente, la actividad funcional de una vejiga. Una realización aún más preferida de este quinto aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la preparación de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir, parcial o totalmente, la actividad funcional de una vejiga enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una neoplasia benigna o maligna, una infección, un traumatismo, una malformación congénita (como por ejemplo, pero sin limitarse, una extrofia vesical, vejiga contraída o extrofia de cloaca), una vejiga neurógena, incontinencia urinaria, una disfunción vesical, una infección o una litiasis vesical.

25 Una realización más preferida de este quinto aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la preparación de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir, parcial o totalmente, la actividad funcional de una uretra. Una realización aún más preferida de este quinto aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la preparación de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir, parcial o totalmente, la actividad funcional de una uretra enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una neoplasia benigna o maligna, una infección, un traumatismo, una malformación congénita (tal como, por ejemplo, pero sin limitarse, hispospadias o epispadias) o una estenosis.

30 Una realización más preferida de este quinto aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la preparación de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir, parcial o totalmente, la actividad funcional de una córnea. Una realización aún más preferida de este quinto aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la preparación de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir, parcial o totalmente, la actividad funcional de una córnea enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una úlcera corneal, un queratocono, un queratogloblo, un descematocele, un traumatismo, una causticación, una deficiencia límbica, una queratitis atrófica, una distrofia corneal, una queratopatía primaria o secundaria, una infección, un leucoma, una queratopatía bullosa, un insuficiencia endotelial corneal o una neoplasia benigna o maligna.

35 Una realización más preferida de este quinto aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la preparación de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir, parcial o totalmente, la actividad funcional de una mucosa, preferentemente una mucosa oral. Una realización aún más preferida se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la preparación de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir, parcial o totalmente, la actividad funcional de una mucosa oral enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una herida, una úlcera, una quemadura, una neoplasia benigna o maligna, una infección, una contusión, un traumatismo, una causticación, una malformación congénita, una pérdida de sustancia o una enfermedad periodontal. En una realización preferida, el tejido que se utiliza para la preparación de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir, parcial o totalmente, la actividad funcional de una mucosa es un tejido que entre la etapa (d) y la etapa (e), se ha sometido a una etapa (d2) de adición de una proteína. En una realización aún más preferida, dicha etapa se lleva a cabo añadiendo, al material obtenido en la etapa (d), una composición que comprende colágeno, tal y como se describió en detalle anteriormente.

Un sexto aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención.

5 Una realización preferida de este sexto aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para su uso en terapia celular somática.

10 Una realización más preferida de este sexto aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir, parcial o totalmente, la actividad funcional de un tejido o un órgano.

15 Una realización preferida de este sexto aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir, parcial o totalmente, la actividad funcional de un tejido o un órgano enfermo o dañado como consecuencia de una enfermedad infecciosa, inflamatoria, genética o degenerativa, un daño físico o químico o una interrupción del flujo sanguíneo.

20 Una realización más preferida de este sexto aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir, parcial o totalmente, la actividad funcional de una piel. Una realización aún más preferida se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir, parcial o totalmente, la actividad funcional de una piel enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una herida, una úlcera, una quemadura, una neoplasia benigna o maligna, una infección, una contusión, un traumatismo, una causticación o una malformación congénita.

25 Una realización más preferida de este sexto aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir, parcial o totalmente, la actividad funcional de una vejiga. Una realización aún más preferida se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir, parcial o totalmente, la actividad funcional de una vejiga enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una neoplasia benigna o maligna, una infección, un traumatismo, una malformación congénita (tal como, por ejemplo, pero sin limitarse, una extrofia vesical, vejiga contraída o extrofia de cloaca), una vejiga neurógena, incontinencia urinaria, una disfunción vesical, una infección o una litiasis vesical.

35 Una realización más preferida de este sexto aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir, parcial o totalmente, la actividad funcional de una uretra. Una realización aún más preferida se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir, parcial o totalmente, la actividad funcional de una uretra enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una neoplasia benigna o maligna, una infección, un traumatismo, una malformación congénita (tal como, por ejemplo, pero sin limitarse, hispospadias o epispadias) o una estenosis.

40 Una realización más preferida de este sexto aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir, parcial o totalmente, la actividad funcional de una córnea. Una realización aún más preferida se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir, parcial o totalmente, la actividad funcional de una córnea enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una úlcera corneal, un queratocono, un queratoglobo, un descematocele, un traumatismo, una causticación, una deficiencia limbica, una queratitis atrófica, una distrofia corneal, una queratopatía primaria o secundaria, una infección, un leucoma, una queratopatía bullosa, una insuficiencia endotelial corneal o una neoplasia benigna o maligna.

45 Una realización más preferida de este quinto aspecto se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para la preparación de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir, parcial o totalmente, la actividad funcional de una mucosa, preferentemente una mucosa oral. Una realización aún más preferida se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir, parcial o totalmente, la actividad funcional de una mucosa oral enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una herida, una úlcera, una quemadura, una neoplasia benigna o maligna, una infección, una contusión, un traumatismo, una causticación, una malformación congénita, una pérdida de sustancia o una enfermedad periodontal. En una forma, la composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para la preparación de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir, parcial o totalmente, la actividad funcional de una mucosa o de una mucosa oral es un tejido que, entre la etapa (d) y la etapa (e), se ha sometido a una etapa (d2) de adición de una proteína. En una forma de realización aún más preferida, dicha etapa se lleva a cabo añadiendo, al material obtenido en la etapa (d), una composición que comprende colágeno, tal y como se describió en detalle anteriormente.

65 En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición farmacéutica comprende el tejido artificial de la invención, y además, un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización preferida de este

aspecto de la invención, la composición farmacéutica comprende el tejido artificial de la invención, y además, otro principio activo. En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición farmacéutica comprende el tejido artificial de la invención y, además, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, otro principio activo.

5 Tal y como se utilizan en el presente documento, las expresiones "principio activo", "sustancia activa", "sustancia farmacéuticamente activa" o "principio farmacéuticamente activo", significan cualquier componente que proporcione en potencia una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de una enfermedad, o que afecte a la estructura o función del cuerpo de un ser humano o de otros animales.

10 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden utilizarse en un método de tratamiento de forma aislada o junto con otros compuestos farmacéuticos.

15 A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones, la palabra "comprende" y sus variantes, no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se entenderán en parte a partir de la descripción y en parte a partir de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## 20 Ejemplos

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente, sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que se reivindica en el presente documento. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar su campo de aplicación

### Ejemplo 1. Protocolo de preparación de un producto de piel humana artificial

#### 30 A.-Obtención de muestras de piel humana

Se utilizan muestras de piel de espesor completo obtenidas de donantes, extraídas con anestesia local y locorregional. Una vez obtenida la muestra de forma estéril, con la ayuda de unas tijeras se eliminará el tejido graso subcutáneo hasta dejar expuesta la capa de dermis. A continuación, los tejidos extraídos se introducirán inmediatamente en un medio de transporte estéril constituido por medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con antibióticos (500 U/ml de penicilina G y 500 µg/ml de estreptomycin) y antimicóticos (1,25 µg/ml de anfotericina B) para impedir una eventual contaminación de la muestra.

#### 40 B.- Generación de cultivos primarios de fibroblastos y queratinocitos

Transcurrido el periodo de transporte, todas las muestras deben lavarse dos veces en una solución estéril de PBS con penicilina, estreptomycin y anfotericina B (500 U/ml, 500 µg/ml y 1,25 µg/ml, respectivamente) para eliminar todos los restos de sangre, fibrina, grasa o materiales extraños que pudieran encontrarse adheridos a las muestras.

45 En primer lugar, para separar la dermis de la epidermis, las muestras se incuban a 37 °C en una solución estéril con 2 mg/ml de dispasa II en PBS. De este modo, se consigue disgregar la membrana basal sobre la cual se ancla el epitelio a la dermis, por lo que tras esto, se conseguirá separar mecánicamente, por un lado, el epitelio y, por el otro, la dermis.

50 Una vez separado, el epitelio correspondiente a la epidermis, se fragmenta con tijeras hasta obtener pequeños fragmentos para posteriormente incubarlos en una solución de tripsina-EDTA. Con la ayuda de una pipeta empapada en tripsina-EDTA, este epitelio se transfiere a un matraz con un agitador magnético previamente esterilizado. Al matraz con agitador se añaden 2,5 ml de tripsina-EDTA y se incuba a 37 °C durante 10 minutos para separar enzimáticamente los queratinocitos de la epidermis. Transcurrido este tiempo, la tripsina que contenía los queratinocitos separados se recoge en un tubo cónico de 50 ml con ayuda de una pipeta, procurando no arrastrar con ella fragmentos de epitelio. Se neutraliza con la misma cantidad de medio de cultivo complementado con suero bovino fetal al 10 % y se centrifuga durante 10 minutos a 1000 rpm. El sedimento resultante que contiene una gran cantidad de queratinocitos separados se resuspende en 2-3 ml de medio de cultivo de queratinocitos, que favorece preferentemente el crecimiento de las células epiteliales sobre los fibroblastos. Este medio está compuesto por 3 partes de medio DMEM rico en glucosa y una parte de medio Ham F-12, todo ello complementado con suero bovino fetal al 10 %, antibióticos-antimicóticos (100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomycin y 0,25 µg/ml de anfotericina B), 24 µg/ml de adenina y distintos factores de crecimiento: 0,4 µg/ml de hidrocortisona, 5 µg/ml de insulina, 10 ng/ml de factor de crecimiento epitelial (EGF), 1,3 ng/ml de triyodotironina y 8 ng/ml de toxina colérica.

65 Para llevar a cabo la digestión de la matriz extracelular de la dermis de la piel y conseguir la separación de los fibroblastos estromales incluidos en dicha matriz, las muestras deben incubarse a 37 °C en una solución estéril de 2

5 mg/ml de colagenasa de tipo I de *Clostridium hystoliticum* en medio de cultivo DMEM sin suero bovino fetal durante 6 horas. Esta solución es capaz de digerir el colágeno de la dermis y liberar los fibroblastos estromales. Para la obtención de cultivos primarios de fibroblastos, la solución de digestión que contiene las células estromales digeridas, debe centrifugarse a 1 .000 rpm durante 10 minutos y el sedimento celular correspondiente a los fibroblastos se cultiva en matraces de cultivo de 15 cm<sup>2</sup> de superficie. Como medio de cultivo, se utiliza DMEM enriquecido en glucosa complementado con antibióticos y antimicóticos (100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomycinina y 0,25 µg/ml de anfotericina B) y suero bovino fetal (SBF) al 10 %. A este medio de cultivo básico se le denomina medio de fibroblastos.

10 En todos los casos, las células se incubarán a 37 °C con dióxido de carbono al 5 % en condiciones estándar de cultivo celular. Los medios de cultivo se renuevan cada tres días.

C.- Subcultivo de las células procedentes de cultivos primarios de piel.

15 Una vez alcanzada la confluencia celular, los distintos cultivos celulares de fibroblastos o queratinocitos deben lavarse con PBS estéril e incubarse en 1-3 ml de una solución de tripsina 0,5 g/l y EDTA 0,2 g/l a 37 °C durante 10 minutos. Así se consigue disgregar los mecanismos de adhesión celular y obtener células separadas y no adheridas a la superficie del matraz de cultivo de queratinocitos y dermis.

20 Para el caso de la dermis, una vez que las células se desprenden de la superficie de los matraces de cultivo, se procede a inactivar la tripsina utilizada mediante la adición de 10 ml de medio de cultivo de fibroblastos. La presencia de abundantes proteínas séricas puede inactivar la acción proteolítica de la tripsina. En los queratinocitos, se utiliza el medio de cultivo de queratinocitos.

25 Posteriormente, las soluciones de queratinocitos y de fibroblastos en las que se encuentran las células desprendidas, se centrifugan a 1000 rpm durante 10 minutos para obtener un sedimento o agrupación celular con las células de interés, desechándose el sobrenadante con la tripsina. El sedimento celular se resuspende cuidadosamente en 5 ml de medio de cultivo y estas células se cultivan en matraces de cultivo de 15, 25 o 75 cm<sup>2</sup> de superficie.

30 Habitualmente, los cultivos de queratinocitos se expanden hasta aproximadamente cinco veces en nuevos matraces de cultivo.

35 En todos los casos, y para garantizar una adecuada viabilidad celular, la preparación de sustitutos de piel se llevó a cabo utilizando células correspondientes a los cuatro primeros subcultivos.

D.- Construcción de productos de piel humana artificial basados en fibrina y agarosa mediante ingeniería tisular.

40 1- Generación de sustitutos de la dermis con fibroblastos inmersos en su interior utilizando matrices extracelulares de fibrina y agarosa. Estos sustitutos dérmicos se generarán directamente sobre insertos porosos de 0,4 µm de diámetro para permitir el paso de nutrientes pero no de las propias células. Para preparar 10 ml de sustituto dérmico se procederá del siguiente modo:

- 45 - obtención de 7,6 ml de plasma sanguíneo humano procedente de donaciones (posiblemente de origen autólogo).
- adición de 150.000 fibroblastos de piel humana previamente cultivados y resuspendidos en 750 µl de medio de cultivo DMEM.
- adición de 150 µl de ácido tranexámico para impedir la fibrinólisis del gel de fibrina.
- adición de 1 ml de ClCa<sub>2</sub> al 1 % para inducir la reacción de coagulación y generar una red de fibras de fibrina.
- 50 - adición rápida de 0,5 ml de agarosa de tipo VII al 2 % disuelta en PBS y calentada hasta alcanzar el punto de fusión y mezclado suave con agitación. La concentración final de agarosa en la mezcla será del 0,1 %. El intervalo de concentraciones de agarosa que permite obtener productos dérmicos viables varía entre 0,025 % y 0,3 % y deberá establecerse en relación con el paciente objeto de su utilización.
- dividir en alícuotas, lo antes posible, en los insertos porosos de cultivo celular.
- 55 - dejar polimerizar en reposo durante al menos 30 min.

2.- Desarrollo de una capa de epitelio (epidermis) en la superficie del sustituto dérmico mediante subcultivo de queratinocitos sobre el sustituto dérmico. Cubrir con medio de cultivo específico para queratinocitos.

60 3.- Mantener en una incubadora a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 % en ambiente húmedo siguiendo protocolos estándar de cultivo celular. Los medios de cultivo se renuevan cada 3 días hasta que las células epiteliales alcanzan la confluencia en la superficie del sustituto dérmico (alrededor de una semana).

4.- Exponer la superficie epitelial al aire (técnica de aire y líquido) manteniendo el sustituto dérmico sumergido en medio de cultivo para promover la estratificación y la maduración de la epidermis (alrededor de una semana).

65 5.- Extraer el producto de piel humana artificial de la superficie de cultivo y proceder a su deshidratación parcial depositándolo sobre un papel de filtro estéril de 3-5 mm de espesor colocado sobre una superficie plana de vidrio estéril. Colocar un fragmento de tul o tela porosa de nylon esterilizada con alcohol al 70 % sobre la superficie del sustituto de piel para impedir que la capa epitelial del sustituto de piel se adhiera al papel de filtro. Tras ello, colocar

un segundo papel de filtro estéril de 3-5 mm de espesor sobre el sustituto de piel cubierto con tela. Depositar un fragmento plano de vidrio estéril en su superficie y colocar un objeto de aproximadamente 250 g de peso sobre éste (Figura 1). Todo el proceso ha de realizarse en una campana de flujo laminar a temperatura ambiente durante 10 minutos. El objetivo de este proceso es reducir significativamente los niveles de hidratación del producto para alcanzar niveles óptimos de consistencia y elasticidad.

Evaluación del producto artificial de piel humana (Figura 2):

1) Análisis microscópico del producto de piel artificial humana (control de calidad histológico).

La evaluación del producto de piel artificial reveló que su estructura presentaba numerosas similitudes con la piel humana normal natural, aunque el tiempo de desarrollo en cultivo influía directamente sobre la estructura de estos productos artificiales. En concreto, el análisis de muestras mantenidas en cultivo durante cuatro semanas, reveló lo siguiente:

Evaluación *in vitro* (Figura 2A):

- Los productos de piel evaluados a la semana de su preparación presentaron una gruesa capa estromal en la que existe una abundante población de fibroblastos en proliferación. Sobre la superficie de este sustituto estromal, se apreció una única capa de células epiteliales.
- En la segunda semana de desarrollo en cultivo, se observó un mayor número de células en el estroma, así como una estratificación inicial del epitelio, formándose una o dos hileras de queratinocitos en su superficie.
- A partir de este momento, continúa la proliferación de queratinocitos, observándose en la tercera semana una nueva hilera de células en el epitelio.
- En la cuarta semana había un total de 3 a 4 hileras de células, pero no fue posible distinguir los distintos estratos del epitelio. No se apreciaron papilas, anejos cutáneos o estrato córneo.

Evaluación *in vivo* (Figura 2B): Al contrario de lo que se observó en los productos de piel artificial mantenidos en cultivo, la piel artificial implantada en un modelo animal presentó niveles de estructuración y diferenciación tisular muy adecuados, tal como se describe a continuación.

- El día diez, tras haber realizado la implantación del producto en el ratón, se pudo observar la presencia de una dermis muy rica en células y con algunas fibras y material extracelular desorganizado. Destaca la presencia de infiltrados leucocitarios en la dermis, así como la neoformación de un tejido vascular importante que comprende arteriolas, vénulas y capilares. A nivel epitelial, se observan entre tres y cinco capas celulares, no apreciándose de forma clara los estratos espinoso y granuloso, aunque sí el basal y un estrato córneo incipiente. De igual modo, se observa una línea dermoepidérmica homogénea, aunque sin la presencia de papilas ni anejos cutáneos.
- Después de veinte días del implante en los animales atímicos, se apreció una disminución en la concentración de fibroblastos y leucocitos de la dermis, así como un aumento significativo del contenido fibrilar en la dermis. De igual modo, se observó la existencia de entre cuatro y seis capas de queratinocitos epidérmicos, distinguiéndose en este momento cuatro estratos diferenciados: basal, espinoso, granuloso y córneo, siendo el estrato espinoso el menos evidente de los cuatro. Al igual que a los diez días de evolución, se aprecia una línea dermoepidérmica homogénea, aunque sin la presencia de papilas ni anejos cutáneos.
- En la muestra del día treinta se observó un mayor contenido fibrilar en la dermis que en días anteriores, apreciándose ya gran cantidad de estratos en el epitelio, existiendo entre seis y nueve capas de queratinocitos, con una clara diferenciación de estratos epiteliales (basal, espinoso, granuloso y córneo). Tampoco se apreciaron papilas ni anejos cutáneos.
- El día cuarenta de evolución *in vivo*, se observó un mayor contenido en fibras en el estrato dérmico, estabilizándose el número de capas de queratinocitos del epitelio (entre seis y nueve). No se evidenciaron papilas en unión dermoepidérmica ni anejos cutáneos.

2) Análisis inmunohistoquímico del producto de piel artificial humana (Figura 2C).

El análisis de la expresión de citoqueratinas (pancitoqueratina, citoqueratina 1 y citoqueratina 10), filagrina e involucrina de los controles de piel humana normal y los productos de piel obtenidos en el laboratorio, permitió determinar un patrón de expresión específico de estas proteínas para cada tipo de muestra, demostrándose que la piel humana artificial es capaz de expresar las mismas proteínas de superficie que la piel humana normal.

**Ejemplo 2. Preparación de un producto de piel humana artificial utilizando células madre de gelatina de Wharton**

A.-Obtención de muestras de piel y de cordón umbilical humano.

Se utilizan muestras de piel de espesor completo obtenidas de donantes, extraídas con anestesia local y locorregional. Una vez obtenida la muestra de forma estéril, con la ayuda de unas tijeras se eliminará el tejido graso subcutáneo hasta dejar expuesta la capa de dermis. A continuación, los tejidos extraídos se introducirán inmediatamente en un medio de transporte estéril constituido por medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con antibióticos (500 U/ml de penicilina G y 500 µg/ml de estreptomina) y antimicóticos (1,25 µg/ml de anfotericina B) para impedir una eventual contaminación de la muestra.

Los cordones umbilicales utilizados se obtienen de partos por cesárea de mujeres gestantes a término. Después de cada parto, se obtiene un fragmento de 10–15 cm del cordón umbilical que se lleva inmediatamente al laboratorio en un medio de transporte similar al que se utiliza para la piel.

B.- Generación de cultivos primarios de fibroblastos y de células madre de gelatina de Wharton.

Transcurrido el periodo de transporte, todas las muestras deberán lavarse dos veces en una solución estéril de PBS con penicilina, estreptomina y anfotericina B (500 U/ml, 500 µg/ml y 1,25 µg/ml, respectivamente) para eliminar todos los restos de sangre, fibrina, grasa o materiales extraños que pudieran encontrarse adheridos a las muestras. Posteriormente, se procesa cada tipo de muestra de forma independiente:

- En el caso de la piel, primero se separa la dermis de la epidermis incubando las muestras a 37 °C en una solución estéril con 2 mg/ml de dispasa II en PBS. De este modo, se consigue disgregar la membrana basal sobre la cual se ancla el epitelio a la dermis, por lo que tras esto se conseguirá separar mecánicamente por un lado el epitelio y por otro la dermis.

Para llevar a cabo la digestión de la matriz extracelular de la dermis de la piel y conseguir la separación de los fibroblastos estromales incluidos en dicha matriz, las muestras deben incubarse durante 6 horas a 37 °C en una solución estéril de 2 mg/ml de colagenasa de tipo I de *Clostridium histolyticum* en medio de cultivo DMEM sin suero bovino fetal. Esta solución es capaz de digerir el colágeno de la dermis y liberar los fibroblastos estromales. Para la obtención de cultivos primarios de fibroblastos, se debe centrifugar a 1.000 rpm durante 10 minutos la solución de digestión que contiene las células estromales disgregadas de la dermis y el sedimento celular correspondiente a los fibroblastos se cultiva en matraces de cultivo de 15 cm<sup>2</sup> de superficie. Como medio de cultivo, se utiliza DMEM enriquecido en glucosa complementado con antibióticos y antimicóticos (100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomina y 0,25 µg/ml de anfotericina B) y suero bovino fetal (SBF) al 10 %. A este medio de cultivo básico se le denomina medio de fibroblastos.

- En el caso del cordón umbilical, las muestras se seccionan longitudinalmente a través de la vena umbilical. Se retirarán cuidadosamente las arterias y la vena umbilical para separar la gelatina de Wharton. Posteriormente, se fragmenta la gelatina hasta convertirla en fragmentos de tejido muy pequeños. Estos fragmentos de gelatina de Wharton se incuban en 30 ml de colagenasa de tipo I (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe, Alemania) a 37 °C con agitación durante aproximadamente 4–6 horas, para posteriormente recoger las células disociadas mediante centrifugación durante 7 min a 1050 revoluciones por minuto (rpm). A continuación, se elimina cuidadosamente el sobrenadante y el sedimento celular se resuspende en 5–10 ml de tripsina previamente diluida (Sigma-Aldrich). De nuevo, se incuba a 37 °C en un baño con agitación durante 30 minutos. Después, se neutralizaron los efectos de la tripsina añadiendo 10–20 ml de medio de cultivo complementado con suero bovino fetal al 10 %, centrifugándose de nuevo a 1000 rpm durante 10 minutos para obtener las células aisladas. Finalmente, estas células se resuspenden en medio de cultivo Amniomax en un matraz de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>.

En todos los casos, las células se incubarán a 37 °C con dióxido de carbono al 5 % en condiciones de cultivo celular estándar. Los medios de cultivo se renuevan cada tres días.

C.- Subcultivo de células procedentes de cultivos primarios de piel y de células madre de gelatina de Wharton.

Una vez alcanzada la confluencia celular, los distintos cultivos de fibroblastos o de células madre de gelatina de Wharton se deben lavar con PBS estéril e incubar en 1-3 ml de una solución de tripsina 0,5 g/l y EDTA 0,2 g/l a 37 °C durante 10 minutos.

Así se consigue disgregar los mecanismos de adhesión celular y obtener células individualizadas y no adheridas a la superficie del matraz de cultivo.

Una vez que las células se desprenden de la superficie de los matraces de cultivo, se procede a inactivar la tripsina utilizada añadiendo 10 ml de medio de cultivo de fibroblastos. La presencia de abundantes proteínas séricas es capaz de inactivar la acción proteolítica de la tripsina.

Posteriormente, las soluciones en las que se encuentran las células desprendidas, se centrifugan a 1000 rpm durante 10 minutos para obtener un sedimento o agrupación celular con las células de interés, desechándose el sobrenadante con la tripsina. El sedimento celular se resuspende cuidadosamente en 5 ml de medio de cultivo y estas células se cultivan en matraces de cultivo de 15, 25 o 75 cm<sup>2</sup> de superficie.

Habitualmente, los cultivos de queratinocitos se expanden hasta aproximadamente cinco veces en nuevos matraces de cultivo.

D.- Construcción de piel humana artificial basada en fibrina y agarosa mediante ingeniería tisular.

1- Generación de sustitutos de dermis con fibroblastos inmersos en su interior utilizando matrices extracelulares de fibrina y agarosa. Estos sustitutos dérmicos se generarán directamente sobre insertos porosos de 0,4 µm de diámetro para permitir el paso de nutrientes pero no el de las propias células. Para preparar 10 ml de sustituto dérmico se procederá del siguiente modo:

- obtención de 7,6 ml de plasma sanguíneo humano procedente de donaciones (posiblemente de origen autólogo).
- adición de 150.000 fibroblastos de piel humana previamente cultivados y resuspendidos en 750 µl de medio de cultivo DMEM.
- adición de 150 µl de ácido tranexámico para impedir la fibrinólisis del gel de fibrina.
- adición de 1 ml de  $CaCl_2$  al 1 % para inducir la reacción de coagulación y generar una red de fibras de fibrina.
- adición rápida de 0,5 ml de agarosa de tipo VII al 2 % disuelta en PBS y calentada hasta alcanzar el punto de fusión y mezclado suave con agitación. La concentración final de agarosa en la mezcla será del 0,1 %. El intervalo de concentraciones de agarosa que permite obtener productos dérmicos viables varía entre 0,025 % y 0,3 % y deberá establecerse en relación con el paciente objeto de su utilización.
- dividir en alícuotas, lo antes posible, en los insertos porosos de cultivo celular.
- dejar polimerizar en reposo durante al menos 30 min.

2. Desarrollo de una capa de epitelio en la superficie del sustituto dérmico mediante subcultivo de células madre de gelatina de Wharton sobre el sustituto dérmico. Cubrir con medio de cultivo específico para queratinocitos. Este medio está compuesto por 3 partes de medio DMEM rico en glucosa y una parte de medio Ham F-1 2, todo ello complementado con suero bovino fetal al 10 %, antibióticos-antimicóticos (100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomycinina y 0,25 µg/ml de anfotericina B), 24 µg/ml de adenina y distintos factores de crecimiento: 0,4 µg/ml de hidrocortisona, 5 µg/ml de insulina, 10 ng/ml de factor de crecimiento epitelial (EGF), 1,3 ng/ml de triyodotironina y 8 ng/ml de toxina colérica.

3.- Mantener en una incubadora a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 % en ambiente húmedo siguiendo protocolos estándar de cultivo celular. Los medios de cultivo se renuevan cada 3 días hasta que las células epiteliales alcanzan la confluencia en la superficie del sustituto dérmico (alrededor de una semana).

4.- Exponer la superficie epitelial al aire (técnica de aire y líquido) manteniendo el sustituto dérmico sumergido en medio de cultivo para promover la estratificación y la maduración de la epidermis (alrededor de una semana).

5.- Extraer el producto de piel humana artificial de la superficie de cultivo y proceder a su deshidratación parcial depositándolo sobre un papel de filtro estéril de 3-5 mm de espesor colocado sobre una superficie plana de vidrio estéril. Colocar un fragmento de tul o tela porosa de nylon esterilizada con alcohol al 70 % sobre la superficie del sustituto de piel para impedir que la capa epitelial del sustituto de piel se adhiera al papel de filtro. Tras ello, colocar un segundo papel de filtro estéril de 3-5 mm de espesor sobre el sustituto de piel cubierto con tela. Depositar un fragmento plano de vidrio estéril en su superficie y colocar un objeto de aproximadamente 250 g de peso sobre éste (Figura 1). Todo el proceso ha de realizarse en una campana de flujo laminar a temperatura ambiente durante 10 minutos. El objetivo de este proceso es reducir significativamente los niveles de hidratación del producto para alcanzar niveles óptimos de consistencia y elasticidad.

Evaluación del producto de piel humana artificial con células de gelatina de Wharton (Figura 3):

1) Determinación de la viabilidad de células madre de gelatina de Wharton (control de calidad microanalítico) (Figura 3A).

La determinación de la viabilidad celular mediante las técnicas de microanálisis de energía dispersiva de rayos X permite determinar el perfil de concentración intracelular de iones de Na, Mg, P, Cl, K, S y Ca, y por tanto conocer el subcultivo más adecuado para su utilización posterior en la construcción de tejidos artificiales. Para ello es necesario realizar la siguiente metodología.

- a) Cultivo de las células sobre rejillas de oro previamente recubiertas con una capa de resina (pioloform). Una vez alcanzada la subconfluencia de las células, las rejillas se lavan con agua destilada a 4 °C durante 10 segundos para eliminar el medio de cultivo.
- b) Criofijación de las células en nitrógeno líquido.
- c) Deseccación de las muestras criofijadas mediante la técnica de liofilización al vacío a baja temperatura (-100 °C) durante 20 horas. La criofijación se realiza en un liofilizador Polaron E5300.
- d) Montaje de las muestras criofijadas y desecadas en portamuestras específicos.
- e) Recubrimiento de las células con carbón en un pulverizador Polaron E-5000.
- f) Observación con un Microscopio Electrónico de Barrido Philips XL-30 equipado con un detector de energía

dispersiva de rayos X (EDAX), y un detector de electrones retrodispersados.

g) Análisis microanalítico cualitativo utilizando las siguientes constantes: voltaje 10 Kv, aumento 10.000 x, ángulo de superficie 0°, ángulo de percepción .35°, 500 cps, tiempo de acumulación de cuentas: 200 segundos. De este modo, se obtienen los espectros cualitativos de cada célula estudiada. En dichos espectros se seleccionan los niveles de Na, Mg, P, Cl, K, Ca en sus orbitales K, contabilizándose las cuentas por segundo (CPS), el fondo (BKGD, *background*) o radiaciones no características y el índice de pico/fondo (P/B).

h) Análisis microanalítico cuantitativo. En primer lugar, se cuantifican las concentraciones de los elementos Na, Mg, P, Cl, S, K, y Ca en mmol/Kg de peso seco mediante una modificación del método de Hall (Hall et al., 1973; Staham y Pawley, 1978). Para ello, se utilizan sales estándares de Na, Mg, P, Cl, K, S y Ca disueltas en dextrano al 20 % (300.000 Dalton), obteniéndose una curva o recta patrón. Estas sales se tratan del mismo modo que los especímenes a analizar. Finalmente, se calculan las concentraciones de cada uno de los elementos analizados utilizando el método de la regresión lineal a partir de las curvas patrón.

Los resultados obtenidos tras la cuantificación de los niveles iónicos en las células madre de la gelatina de Wharton, ponen claramente de manifiesto que los niveles más elevados del índice K/Na corresponden a los subcultivos cuarto y quinto y por tanto, éstos se consideran los más idóneos para su utilización en la fabricación de piel humana mediante ingeniería tisular.

2) Análisis microscópico de los productos de piel artificial humana (control de calidad histológico) (Figura 3B).

La evaluación de los productos de piel artificial humana con células de gelatina de Wharton reveló que la estructura de éstos presentaba numerosas similitudes con la piel humana normal natural, aunque el tiempo de desarrollo en cultivo influía directamente sobre la estructura de estos tejidos artificiales. En concreto, el análisis de muestras mantenidas en cultivo durante cuatro semanas reveló la formación progresiva de hasta 5 capas de epitelio en la superficie de la construcción, aunque las uniones intercelulares no se formaron hasta las últimas fases. Posteriormente, la evaluación *in vivo* de los productos de piel humana generada con células madre de gelatina de Wharton, mostró el desarrollo de una gruesa capa de epitelio sobre el estroma artificial, formándose numerosas uniones intercelulares de tipo desmosoma y una membrana basal bien constituida. Todo ello dio como resultado un producto de piel artificial indistinguible de la piel humana normal natural, demostrando la utilidad del producto generado.

3) Análisis inmunohistoquímico del producto de piel artificial humana (Figura 3C).

El análisis de la expresión de citoqueratinas (pancitoqueratina, citoqueratina 1 y citoqueratina 10), filagrina e involucrina de los controles de piel humana normal y los productos de piel obtenidos en el laboratorio a partir de células madre de gelatina de Wharton, permitió determinar un patrón de expresión específico de estas proteínas para cada tipo de muestra, demostrándose que los productos de piel humana artificial son capaces de expresar las mismas proteínas de superficie que la piel humana normal.

### 40 Ejemplo 3. Preparación de córneas artificiales.

Protocolo de preparación de córneas artificiales:

El protocolo descrito a continuación es semejante en el producto corneal humano y animal, a excepción de la incorporación del estrato endotelial en el producto corneal animal.

A. Generación de cultivos primarios de células de la córnea. Para establecer cultivos primarios de epitelio corneal, queratocitos estromales y endotelio corneal, si procede, se utilizaron los siguientes métodos y protocolos:

- Obtención de una biopsia del limbo esclerocorneal con anestesia local o general y transporte al laboratorio en suero fisiológico estéril.

- Tallado quirúrgico de la córnea para eliminar restos de iris, conjuntiva y coágulos sanguíneos.

- En el producto corneal animal, disección quirúrgica de la membrana de Descemet para aislar las células epiteliales, las cuales se cultivan en medio para células endoteliales. La composición de este medio es la siguiente: 3 partes de medio DMEM y una parte de medio Ham F-12, todo ello complementado con suero bovino fetal al 10 %, antibióticos-antimicóticos, 24 µg/ml de adenina y distintos factores de crecimiento: 0,4 µg/ml de hidrocortisona, 5 µg/ml de insulina, 1,3 ng/ml de triyodotironina y 8 ng/ml de toxina colérica.

- Disección de 2 mm de córnea central e incubación en colagenasa I al 2 % durante 6 h a 37°C. Centrifugación a 1000 rpm durante 10 min para recoger las células madre adultas del estroma corneal (queratocitos), las cuales se cultivarán en medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) con suero bovino fetal al 10 % y antibióticos.

- Fragmentación del limbo esclerocorneal en pequeños explantes de alrededor de 1 mm y cultivo de estos explantes directamente sobre la superficie de matraces de cultivo para la obtención de cultivos primarios de células epiteliales corneales. El medio de cultivo a utilizar (medio de células epiteliales) está compuesto por 3 partes de medio DMEM y una parte de medio Ham F-12, todo ello complementado con suero bovino fetal al 10 %, antibióticos-antimicóticos, 24 µg/ml de adenina y distintos factores de crecimiento: 0,4 µg/ml de hidrocortisona, 5

µg/ml de insulina, 1,3 ng/ml de triyodotironina, 8 ng/ml de toxina colérica y 10 ng/ml de factor de crecimiento epitelial (EGF).

5 Todos los cultivos se mantienen en una incubadora a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 % en un ambiente húmedo siguiendo protocolos estándar de cultivo celular. Los medios de cultivo se renuevan cada 3 días hasta que las células alcanzan la confluencia en cultivo.

B. Construcción en laboratorio de productos corneales mediante ingeniería tisular.

10 1 - Subcultivo de las células endoteliales previamente aisladas, utilizando para ello insertos porosos de 0,4 µm de diámetro para permitir el paso de nutrientes pero no de las propias células. Las células seleccionadas deben pertenecer al cuarto subcultivo (máxima viabilidad de las células endoteliales). Esta primera etapa solo se realizará para la generación del producto corneal animal trilaminar.

15 2- Generación de sustitutos del estroma corneal con queratocitos inmersos en su interior utilizando matrices extracelulares de fibrina y agarosa sobre los insertos porosos de 0,4 µm de diámetro (esta será la primera etapa en el caso del producto corneal humano bilaminar). Para preparar 10 ml de sustituto estromal:

20 - obtención de 7,6 ml de plasma sanguíneo humano procedente de donaciones (posiblemente de origen autólogo).

- adición de 150.000 fibroblastos de piel humana previamente cultivados y resuspendidos en 750 µl de medio de cultivo DMEM.

- adición de 150 µl de ácido tranexámico para impedir la fibrinólisis del gel de fibrina.

25 - adición de 1 ml de ClCa<sub>2</sub> al 1 % para inducir la reacción de coagulación y generar una red de fibras de fibrina.

- adición rápida de 0,5 ml de agarosa de tipo VII al 2 % disuelta en PBS y calentada hasta alcanzar el punto de fusión y mezclado suave con agitación. La concentración final de agarosa en la mezcla será del 0,1 %. El intervalo de concentraciones de agarosa que permite obtener productos dérmicos viables varía entre 0,025 % y 0,3 % y deberá establecerse en relación con el paciente objeto de su utilización.

30 - dividir en alícuotas, lo antes posible, en los insertos porosos de cultivo celular.

- dejar polimerizar en reposo durante al menos 30 min.

3.- Desarrollo de una capa de epitelio corneal en la superficie del sustituto del estroma corneal mediante subcultivo de las células epiteliales corneales sobre el sustituto estromal. Cubrir con medio de cultivo específico para células epiteliales.

35 4. Mantener en una incubadora a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5% en ambiente húmedo siguiendo protocolos estándar de cultivo celular. Los medios de cultivo se renuevan cada 3 días hasta que las células epiteliales alcanzan la confluencia en la superficie del sustituto estromal (alrededor de una semana).

5. Exponer la superficie epitelial al aire (técnica de aire y líquido) manteniendo el sustituto estromal sumergido en medio de cultivo para promover la estratificación y la maduración del epitelio corneal (alrededor de una semana).

40 6. Extraer el producto de piel humana artificial de la superficie de cultivo y proceder a su deshidratación parcial depositándolo sobre un papel de filtro estéril de 3-5 mm de espesor colocado sobre una superficie plana de vidrio estéril. Colocar un fragmento de tul o tela porosa de nylon esterilizada con alcohol al 70 % sobre la superficie del sustituto de piel para impedir que la capa epitelial del sustituto de piel se adhiera al papel de filtro. Tras ello, colocar un segundo papel de filtro estéril de 3-5 mm de espesor sobre el sustituto de piel cubierto con tela.

45 Depositar un fragmento plano de vidrio estéril en su superficie y colocar un objeto de aproximadamente 250 g de peso sobre éste (Figura 1). Todo el proceso ha de realizarse en una campana de flujo laminar a temperatura ambiente durante 10 minutos. El objetivo de este proceso es reducir significativamente los niveles de hidratación del producto para alcanzar niveles óptimos de consistencia y elasticidad.

50 Evaluación de los productos corneales (Figura 4):

1) Análisis microscópico e inmunohistoquímico de los productos corneales (control de calidad histológico) (Figura 4A).

55 El análisis microscópico reveló que los productos corneales generados mediante ingeniería tisular eran estructuralmente similares a las córneas naturales utilizadas como control. En concreto, se pudo apreciar un epitelio corneal bien formado, con abundantes uniones intercelulares y un estroma compuesto por numerosas fibras de fibrina entre las que se disponían los queratocitos. Todo ello sugiere que los productos corneales artificiales bi o trilaminares contruidos basándose en el protocolo descrito anteriormente, son compatibles con córneas humanas y animales ortóticas.

65 En lo que respecta a la estructura del epitelio de los productos corneales, es de destacar el hecho de que todas las células del epitelio expresaron elevados niveles de citoqueratinas típicas y exclusivas del epitelio corneal (CK3 y CK1 2), lo cual sugiere que estas células podrían ser funcionales *in vitro*. Del mismo modo, el análisis de proteínas relacionadas con uniones intercelulares reveló la expresión secuencial de diversos componentes de los desmosomas (placoglobina, desmogleína 3 y desmoplaquina), las uniones estrechas (ZO-1 y ZO-2) y las uniones

comunicantes gap (conexina 37) a nivel epitelial, siendo todo ello similar a la córnea normal natural.

2) Control de calidad reológico (Figura 4B).

5 El análisis de las propiedades mecánicas de los productos corneales artificiales bi o trilaminares contruidos basándose en el protocolo descrito anteriormente mostró un comportamiento viscoelástico de dichos tejidos, con un módulo de elasticidad creciente en las córneas con mayor contenido en agarosa y un punto de fractura significativamente menor cuando la agarosa se utilizó a menores concentraciones. Los análisis de viscosimetría y punto de fractura revelaron que las características físicas de los productos de fibrina y agarosa eran superiores a aquéllos que solo contenían fibrina o colágeno. Todo ello sugiere que las propiedades físicas de las córneas de fibrina y agarosa son óptimas y, en parte, similares a las de las córneas humanas normales utilizadas como control.

3) Control de calidad óptico (Figura 4C).

15 Las propiedades ópticas de los productos corneales artificiales fueron adecuadas para un tejido que ha de cumplir las funciones de la córnea humana o animal. En concreto, los análisis de transmitancia espectral mostraron que los productos corneales tendían a mostrar niveles muy adecuados de transparencia, comparables a los de la córnea humana normal, con niveles de dispersión muy similares. Además, los coeficientes de absorción, dispersión y extinción de los productos de fibrina y agarosa fueron superiores a los obtenidos con los tejidos de fibrina. Sin embargo, la absorbancia para longitudes de onda pequeñas (intervalo de ultravioleta) fue menor en los productos corneales artificiales bi o trilaminares que en los controles, lo cual sugiere la necesidad de utilizar filtros de luz ultravioleta en este tipo de productos. En suma, la translucidez de los productos corneales fue aceptable, especialmente en aquellos productos cuyo espesor no superaba los 0,7 mm.

25 4) Control de calidad genético (Figuras 4C y 4D).

Para el análisis de expresión génica se extrajo el ARN total de los cultivos corneales primarios de células epiteliales y queratocitos estromales humanos y de los productos corneales artificiales bilaminares humanos, analizándose éste mediante micromatriz (Affymetrix Human Genome U133 plus 2.0®). Este análisis demostró que los genes que se expresaban en los productos corneales artificiales humanos eran compatibles con una función corneal normal, aunque numerosos genes relacionados con el desarrollo tisular estaban sobreexpresados en relación con la córnea normal. En concreto, los productos corneales artificiales expresaron un gran número de genes cuya función se centraba en el establecimiento de uniones intercelulares (conexinas, integrinas, desmoplaquina, placoglobina, etc.), desarrollo epitelial (Sema3A, RUNX2, TBX1), diferenciación celular (PLXNA4A, FLG, DKK4, DCN), membrana basal (lamininas, colágeno IV), matriz extracelular (colágenos, decorina, biglicán, MMP, fibronectina), etc. Estos resultados sugieren que los productos corneales contruidos podrían estar experimentando un proceso de desarrollo similar al que ocurre en la córnea normal y que las funciones génicas expresadas por estos productos son compatibles con la normalidad.

4) Evaluación *in vivo* (Figura 4E).

40 Para evaluar el comportamiento clínico de los productos corneales artificiales, se procedió al implante de 6 córneas humanas bilaminares de espesor parcial en conejos de laboratorio y a su seguimiento evolutivo durante 6 meses. Los resultados de este ensayo muestran niveles de biocompatibilidad adecuados, con total ausencia de inflamación o infección, manteniendo buenos niveles de transparencia. Todo esto sugiere que los productos corneales generados mediante ingeniería tisular podrían presentar posible utilidad desde un punto de vista clínico y farmacológico experimental.

#### **Ejemplo 4. Preparación de un producto de uretra humana artificial.**

50 Protocolo de preparación de un producto de uretra humana artificial:

A.-Obtención de muestras de uretra humana.

55 Para la generación de uretras artificiales, se utilizan pequeñas biopsias de uretra humana normal obtenidas mediante endoscopia de pacientes o donantes normales. Una vez obtenida la muestra de forma estéril, los tejidos extraídos se introducirán inmediatamente en un medio de transporte estéril constituido por medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con antibióticos (500 U/ml de penicilina G y 500 µg/ml de estreptomocina) y antimicóticos (1,25 µg/ml de anfotericina B) para impedir una eventual contaminación de la muestra.

60 Como alternativa, en los casos en los que no es factible la toma de muestras de uretra humana, se pueden utilizar muestras de mucosa oral o de piel para la generación de sustitutos de la uretra.

B.- Generación de cultivos primarios de células estromales y epiteliales.

65 Transcurrido el periodo de transporte, todas las muestras deberán lavarse dos veces en una solución estéril de PBS

con penicilina, estreptomina y anfotericina B (500 U/ml, 500 µg/ml y 1,25 µg/ml, respectivamente) para eliminar todos los restos de sangre, fibrina, grasa o materiales extraños que pudieran encontrarse adheridos a las muestras.

5 En primer lugar, para separar el estroma del epitelio, las muestras se incuban a 37 °C en una solución estéril con tripsina 0,5 g/l y EDTA 0,2 g/l en PBS, recogiendo el sobrenadante con las células tras 30 minutos mediante centrifugación. Este proceso se repite hasta 5 veces añadiendo nueva solución de tripsina-EDTA cada vez. De este modo, se consigue una cantidad apreciable de células epiteliales de la uretra, las cuales se cultivan en medio de cultivo de células epiteliales, el cual favorece preferentemente el crecimiento de las células epiteliales sobre los fibroblastos. Este medio está compuesto por 3 partes de medio DMEM rico en glucosa y una parte de medio Ham F-10  
10 12, todo ello complementado con suero bovino fetal al 10 %, antibióticos-antimicóticos (100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomina y 0,25 µg/ml de anfotericina B), 24 µg/ml de adenina y distintos factores de crecimiento: 0,4 µg/ml de hidrocortisona, 5 µg/ml de insulina, 10 ng/ml de factor de crecimiento epitelial (EGF), 1,3 ng/ml de triyodotironina y 8 ng/ml de toxina colérica.

15 Para llevar a cabo la digestión de la matriz extracelular del estroma uretral y conseguir la separación de los fibroblastos estromales incluidos en dicha matriz, las muestras deben incubarse durante 6 horas a 37 °C en una solución estéril de 2 mg/ml de colagenasa de tipo I de *Clostridium histolyticum* en medio de cultivo DMEM sin suero bovino fetal. Esta solución es capaz de digerir el colágeno de la dermis y liberar los fibroblastos estromales. Para la obtención de cultivos primarios de fibroblastos, se debe centrifugar a 1 .000 rpm durante 10 minutos la solución de digestión que contiene las células estromales disgregadas de la dermis y el sedimento celular correspondiente a los fibroblastos se cultiva en matraces de cultivo de 15 cm<sup>2</sup> de superficie. Como medio de cultivo, se utiliza DMEM enriquecido en glucosa complementado con antibióticos y antimicóticos (100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomina y 0,25 µg/ml de anfotericina B) y suero bovino fetal (SBF) al 10 %. A este medio de cultivo básico se le denomina medio de fibroblastos  
20

25 En todos los casos, las células se incubarán a 37 °C con dióxido de carbono al 5 %, en condiciones estándar de cultivo celular. Los medios de cultivo se renuevan cada tres días.

30 C.- Construcción de productos de uretra humana artificial basados en fibrina y agarosa mediante ingeniería tisular.

1.- Generación de sustitutos estromales con fibroblastos inmersos en su interior utilizando matrices extracelulares de fibrina y agarosa. Estos sustitutos estromales se generarán directamente sobre placas de Petri para cultivo celular. Para preparar 10 ml de sustituto estromal se procederá del siguiente modo:

35 - obtención de 7,6 ml de plasma sanguíneo humano procedente de donaciones (posiblemente de origen autólogo).  
- adición de 150.000 fibroblastos de piel humana previamente cultivados y resuspendidos en 750 µl de medio de cultivo DMEM.

-adición de 150 µl de ácido tranexámico para impedir la fibrinólisis del gel de fibrina.  
-adición de 1 ml de ClCa<sub>2</sub> al 1 % para inducir la reacción de coagulación y generar una red de fibras de fibrina.

40 - adición rápida de 0,5 ml de agarosa de tipo VII al 2 % disuelta en PBS y calentada hasta alcanzar el punto de fusión y mezclada suave con agitación. La concentración final de agarosa en la mezcla será del 0,1 %. El intervalo de concentraciones de agarosa que permite obtener productos dérmicos viables varía entre 0,025 % y 0,3 % y deberá establecerse en relación con el paciente objeto de su utilización.

- dividir en alícuotas, lo antes posible, en los insertos porosos de cultivo celular.

45 - dejar polimerizar en reposo durante al menos 30 min.

2.- Desarrollo de una capa de epitelio (epidermis) en la superficie del sustituto dérmico mediante subcultivo de las células epiteliales sobre el sustituto estromal. Cubrir con medio de cultivo específico para células epiteliales.

50 3.- Mantener en la incubadora a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 % en ambiente húmedo siguiendo protocolos estándar de cultivo celular. Los medios de cultivo se renuevan cada 3 días hasta que las células epiteliales alcanzan la confluencia en la superficie del sustituto dérmico (alrededor de una semana).

4.- Extraer el producto de uretra humana artificial de la superficie de cultivo y proceder a su deshidratación parcial depositándolo sobre un papel de filtro estéril de 3-5 mm de espesor colocado sobre una superficie plana de vidrio estéril. Colocar un fragmento de tul o tela porosa de nylon esterilizada con alcohol al 70 % sobre la superficie del sustituto de piel para impedir que la capa epitelial del sustituto de uretra se adhiera al papel de filtro. Tras ello, colocar un segundo papel de filtro estéril de 3-5 mm de espesor sobre el sustituto de estroma cubierto con tela. Depositar un fragmento plano de vidrio estéril en su superficie y colocar un objeto de aproximadamente 250 g de peso sobre éste (Figura 1). Todo el proceso ha de realizarse en una campana de flujo laminar a temperatura ambiente durante 10 minutos. El objetivo de este proceso es reducir significativamente los niveles de hidratación del producto para alcanzar niveles óptimos de consistencia y elasticidad.  
55

60 5.- Una vez deshidratado el tejido, cortar a medida el sustituto uretral y enrollarlo sobre sí mismo, procediendo a suturarlo con hilo de sutura quirúrgica monofilamento. De este modo, se consigue un sustituto de la uretra con forma tubular muy similar a la uretra humana natural. Cabe destacar que la deshidratación del tejido da como resultado  
65

niveles de consistencia y elasticidad adecuados, permitiendo llevar a cabo el enrollamiento y la sutura sin ninguna dificultad.

Evaluación del producto de uretra humana artificial (Figura 5):

5

1) Análisis microscópico del producto de uretra artificial humana (control de calidad histológico) (Figura 5A).

10

La evaluación de los productos de uretra artificial reveló que la estructura de éstos presentaba numerosas similitudes con la uretra humana normal natural. En concreto, el análisis de muestras mantenidas en cultivo durante cuatro semanas reveló la formación de un epitelio escamoso estratificado en la superficie del estroma artificial y la generación de un estroma denso, rico en fibras, en el que las células estromales proliferaban activamente. Todo ello sugiere que la estructura de la uretra artificial era igual a la de la uretra normal natural.

15

En aquellos casos en los que se utilizaron células de la mucosa oral, se obtuvieron sustitutos estromales muy similares a los obtenidos a partir de células uretrales.

2) Análisis inmunohistoquímico del producto de uretra artificial humana (Figura 5B).

20

El análisis de expresión de citoqueratina de los controles de uretra normal y los productos de uretra artificial obtenidos en el laboratorio, demostró la expresión de integrinas por parte del epitelio uretral artificial, lo cual sugiere que este epitelio es plenamente funcional y podría utilizarse para la sustitución de la uretra humana.

#### **Ejemplo 5. Preparación de un producto de vejiga urinaria artificial**

25

Protocolo de fabricación de un producto de vejiga urinaria humana artificial:

A.-Obtención de muestras de vejiga urinaria humana.

30

Para la generación de sustitutos artificiales de la vejiga urinaria, se utilizan pequeñas biopsias de la vejiga humana normal obtenidas mediante endoscopia de pacientes o donantes normales. Una vez obtenida la muestra de forma estéril, los tejidos extraídos se introducirán inmediatamente en un medio de transporte estéril constituido por medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con antibióticos (500 U/ml de penicilina G y 500 µg/ml de estreptomomicina) y antimicóticos (1,25 µg/ml de anfotericina B) para impedir una eventual contaminación de la muestra.

35

Como alternativa, en los casos en los que no es factible la toma de muestras de vejiga humana, se pueden utilizar muestras de mucosa oral o de piel para la generación de sustitutos vesicales.

40

B.- Generación de cultivos primarios de células estromales y epiteliales.

45

Transcurrido el periodo de transporte, todas las muestras deben lavarse dos veces en una solución estéril de PBS con penicilina, estreptomomicina y anfotericina B (500 U/ml, 500 µg/ml y 1,25 µg/ml, respectivamente) para eliminar todos los restos de sangre, fibrina, grasa o materiales extraños que pudieran encontrarse adheridos a las muestras.

50

En primer lugar, para separar el estroma del epitelio, las muestras se incuban a 37 °C en una solución estéril con tripsina 0,5 g/l y EDTA 0,2 g/l en PBS, recogiendo el sobrenadante con las células después de 30 minutos mediante centrifugación. Este proceso se repite hasta 5 veces añadiendo nueva solución de tripsina-EDTA cada vez. De este modo, se consigue una cantidad apreciable de células epiteliales de la vejiga, las cuales se cultivan en medio de cultivo de células epiteliales, el cual favorece preferentemente el crecimiento de las células epiteliales sobre los fibroblastos. Este medio está compuesto por 3 partes de medio DMEM rico en glucosa y una parte de medio Ham F-12, todo ello complementado con suero bovino fetal al 10 %, anti bióticos-antimicóticos (100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomomicina y 0,25 µg/ml de anfotericina B), 24 µg/ml de adenina y distintos factores de crecimiento: 0,4 µg/ml de hidrocortisona, 5 µg/ml de insulina, 10 ng/ml de factor de crecimiento epitelial (EGF), 1,3 ng/ml de triyodotironina y 8 ng/ml de toxina colérica.

55

Para llevar a cabo la digestión de la matriz extracelular del estroma vesical y conseguir la separación de los fibroblastos estromales incluidos en dicha matriz, las muestras deben incubarse durante 6 horas a 37 °C en una solución estéril de 2 mg/ml de colagenasa de tipo I de *Clostridium hystolicum* en medio de cultivo DMEM sin suero bovino fetal. Esta solución es capaz de digerir el colágeno del estroma y liberar los fibroblastos inmersos en éste.

60

Para la obtención de cultivos primarios de fibroblastos, la solución de digestión que contiene las células estromales disgregadas se debe centrifugar a 1.000 rpm durante 10 minutos y el sedimento celular correspondiente a los fibroblastos se cultiva en matraces de cultivo de 15 cm<sup>2</sup> de superficie. Como medio de cultivo, se utiliza DMEM enriquecido en glucosa complementado con antibióticos y antimicóticos (100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomomicina y 0,25 µg/ml de anfotericina B) y suero bovino fetal (SBF) al 10 %. A este medio básico de cultivo se le denomina medio de fibroblastos.

65

En todos los casos, las células se incubarán a 37 °C con dióxido de carbono al 5 %, en condiciones estándar de cultivo celular. Los medios de cultivo se renuevan cada tres días.

C.- Construcción de productos de vejiga urinaria humana artificial basados en fibrina y agarosa mediante ingeniería tisular.

1 - Generación de sustitutos estromales con fibroblastos inmersos en su interior utilizando matrices extracelulares de fibrina y agarosa. Estos sustitutos estromales se generarán directamente sobre placas de Petri para cultivo celular. Para preparar 10 ml de sustituto estromal se procederá del siguiente modo:

- obtención de 7,6 ml de plasma sanguíneo humano procedente de donaciones (posiblemente de origen autólogo).  
- adición de 150.000 fibroblastos de vejiga humana previamente cultivados y resuspendidos en 750 µl de medio de cultivo DMEM.

-adición de 150 µl de ácido tranexámico para impedir la fibrinólisis del gel de fibrina.

-adición de 1 ml de  $\text{CaCl}_2$  al 1 % para inducir la reacción de coagulación y generar una red de fibras de fibrina.

- adición rápida de 0,5 ml de agarosa de tipo VII al 2 % disuelta en PBS y calentada hasta alcanzar el punto de fusión y mezclada suave con agitación. La concentración final de agarosa en la mezcla será del 0,1 %. El intervalo de concentraciones de agarosa que permite obtener productos dérmicos viables varía entre 0,025 % y 0,3 % y deberá establecerse en relación con el paciente objeto de su utilización.

- dividir en alícuotas, lo antes posible, en las placas de Petri de cultivo celular.

- dejar polimerizar en reposo durante al menos 30 min.

2.- Desarrollo de una capa de epitelio (urotelio) en la superficie del sustituto dérmico mediante subcultivo de las células epiteliales sobre este sustituto. Cubrir con medio de cultivo específico para células epiteliales.

3.- Mantener en una incubadora a 37 °C con  $\text{CO}_2$  al 5 % en ambiente húmedo siguiendo protocolos estándar de cultivo celular. Los medios de cultivo se renuevan cada 3 días hasta que las células epiteliales alcanzan la confluencia en la superficie del sustituto dérmico (alrededor de una semana).

4.- Extraer el producto de vejiga humana artificial de la superficie de cultivo y proceder a su deshidratación parcial depositándolo sobre un papel de filtro estéril de 3-5 mm de espesor colocado sobre una superficie plana de vidrio estéril. Colocar un fragmento de tul o tela porosa de nylon esterilizada con alcohol 70% sobre la superficie del sustituto estromal para impedir que la capa epitelial del sustituto vesical se adhiera al papel de filtro. Tras ello, colocar un segundo papel de filtro estéril de 3-5 mm de grosor sobre el sustituto estromal cubierto por tela. Depositar un fragmento plano de vidrio estéril en su superficie y colocar un objeto de aproximadamente 250 g de peso sobre éste (Figura 1). Todo el proceso debe realizarse en una campana de flujo laminar a temperatura ambiente durante 10 minutos. El objetivo de este proceso es reducir significativamente los niveles de hidratación del producto para alcanzar niveles óptimos de consistencia y elasticidad.

5.- Una vez deshidratado el tejido, cortar a medida el sustituto vesical y suturarlo sobre sí mismo dándole la forma deseada, utilizando hilo de sutura quirúrgica monofilamento. Cabe destacar que la deshidratación del tejido da como resultado niveles de consistencia y elasticidad adecuados, permitiendo llevar a cabo la sutura sin ninguna dificultad.

Evaluación del producto de vejiga urinaria humana artificial (Figura 6):

1) Análisis microscópico e inmunohistoquímico del producto de vejiga artificial humana (control de calidad histológico) (Figuras 6A y 6B).

La evaluación de los productos de vejiga artificial reveló que la estructura de éstos presentaba numerosas similitudes con la vejiga humana normal natural. En concreto, el análisis de muestras mantenidas en cultivo durante cuatro semanas reveló la formación de un epitelio simple cúbico o escamoso en la superficie del estroma artificial y la generación de un estroma denso, rico en fibras, en el que las células estromales proliferaban activamente (Figura 6A).

El análisis inmunohistoquímico reveló que estos tejidos expresaban citoqueratina 13 y pancitoqueratina, al igual que los tejidos de vejiga humana control normal, así como citoqueratinas 7 y 8, típicas de tejidos embrionarios o en proceso de maduración (Figura 6B). Todo ello sugiere que la estructura de la vejiga artificial era igual que la de la vejiga normal natural.

En aquellos casos en los que se utilizaron células de la mucosa oral, se obtuvieron sustitutos estromales muy similares a los obtenidos a partir de células vesicales.

#### **Ejemplo 6. Preparación de productos artificiales mediante biomateriales de fibrina, agarosa y colágeno.**

Protocolo de preparación de productos de mucosa oral humana artificial:

A. Generación de cultivos primarios de células epiteliales y estromales.

Para establecer cultivos primarios de células epiteliales (células epiteliales de la mucosa oral) y estromales (fibroblastos), se utilizan biopsias de mucosa oral normal procedente de donantes humanos o de animales de laboratorio, utilizando los siguientes métodos y protocolos:

- obtención de una biopsia de la mucosa oral y transporte al laboratorio en suero fisiológico estéril.
- aislamiento y cultivo de células epiteliales y estromales utilizando técnicas estándar de digestión enzimática (tripsina o dispasa para aislamiento epitelial y colagenasa para el estroma) o de explante tisular.
- cultivo en medios específicos para células epiteliales o estromales hasta alcanzar la confluencia celular.

Todos los cultivos se mantienen en una incubadora a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 % en un ambiente húmedo siguiendo protocolos estándar de cultivo celular. Los medios de cultivo se renuevan cada 3 días hasta que las células alcanzan la confluencia en cultivo.

B. Construcción en laboratorio de sustitutos tisulares de fibrina, agarosa y colágeno mediante ingeniería tisular.

1- Generación de sustitutos del estroma tisular con células estromales inmersas en su interior. Para preparar 20 ml de sustituto estromal:

a.- Preparar 10 ml de colágeno de tipo I líquido tomando un volumen de colágeno líquido concentrado a 6,4 mg/ml de 8,81 ml. Añadir 1,1 ml de PBS 10X y ajustar el pH a 7,4±0,2 mediante la adición de aproximadamente 90 µl de NaOH. Para elevar el pH se suele utilizar NaOH a una concentración de entre 0,1 y 1 M, aunque también pueden utilizarse otros productos. Mezclar mediante agitación suave y mantener en hielo para impedir la gelificación prematura.

b.- Preparar 10 ml de una mezcla de fibrina y agarosa procediendo del siguiente modo:

- obtención de 7,6 ml de plasma sanguíneo humano procedente de donaciones (posiblemente de origen autólogo).
- adición de 150.000 fibroblastos de vejiga humana previamente cultivados y resuspendidos en 750 µl de medio de cultivo DMEM.
- adición de 150 µl de ácido tranexámico para impedir la fibrinólisis del gel de fibrina.
- adición de 1 ml de ClCa<sub>2</sub> al 1 % para inducir la reacción de coagulación y generar una red de fibras de fibrina.
- adición rápida de 0,5 ml de agarosa de tipo VII al 2 % disuelta en PBS y calentada hasta alcanzar el punto de fusión y mezclado suave con agitación. La concentración final de agarosa en la mezcla será del 0,1 %. El intervalo de concentraciones de agarosa que permite obtener productos dérmicos viables varía entre 0,025 % y 0,3 % y deberá establecerse en relación con el paciente objeto de su utilización.

c.- Mezclar ambas soluciones (de colágeno y de fibrina-agarosa) en proporción variable dependiendo del producto que se quiera generar. En todos los casos, mezclar lo más rápidamente posible ambas soluciones, manteniendo la solución de colágeno en frío hasta el momento exacto de la mezcla.

- Para generar el producto A (2,8 g/l de colágeno, 1,25 g/l de fibrina y 0,5 g/l de agarosa), añadir 10 ml de la solución de colágeno y 10 ml de la solución de fibrina-agarosa.
- Para generar el producto B (3,8 g/l de colágeno, 0,6 g/l de fibrina y 0,25 g/l de agarosa), añadir 15 ml de la solución de colágeno y 5 ml de la solución de fibrina-agarosa.
- Para generar el producto C (1,9 g/l de colágeno, 1,9 g/l de fibrina y 0,75 g/l de agarosa), añadir 5 ml de la solución de colágeno y 15 ml de la solución de fibrina-agarosa.

d.- Dividir en alícuotas lo antes posible en insertos porosos de cultivo celular o en placas de Petri estériles.

e.- Dejar polimerizar en reposo durante al menos 30 min en una incubadora a 37 °C.

2- Desarrollo de una capa de epitelio en la superficie del sustituto estromal mediante subcultivo de las células epiteliales de la mucosa oral sobre el sustituto estromal. Cubrir con medio de cultivo específico para células epiteliales.

3- Mantener en la incubadora a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 % en ambiente húmedo siguiendo protocolos estándar de cultivo celular. Los medios de cultivo se renuevan cada 3 días hasta que las células epiteliales alcanzan la confluencia en la superficie del sustituto estromal (alrededor de una semana).

4- Exponer la superficie epitelial al aire (técnica de aire y líquido) manteniendo el sustituto estromal sumergido en medio de cultivo para promover la estratificación y la maduración del epitelio (alrededor de una semana).

- 5- Extraer el tejido artificial de la superficie de cultivo y proceder a su deshidratación parcial depositándolo sobre un papel de filtro estéril de 3-5 mm de espesor colocado sobre una superficie plana de vidrio estéril. Colocar un fragmento de tul o tela porosa de nylon esterilizada con alcohol al 70 % sobre la superficie del sustituto estromal para impedir que la capa epitelial del sustituto tisular se adhiera al papel de filtro. Tras ello, colocar un segundo papel de filtro estéril de 3-5 mm de grosor sobre el sustituto estromal cubierto por tela. Depositar un fragmento plano de vidrio estéril en su superficie y colocar un objeto de aproximadamente 250 g de peso sobre éste (Figura 1). Todo el proceso debe realizarse en una campana de flujo laminar a temperatura ambiente durante 10 minutos. El objetivo de este proceso es reducir significativamente los niveles de hidratación del producto para alcanzar niveles óptimos de consistencia y elasticidad.
- 6- Una vez deshidratado el tejido, cortarlo a medida dándole la forma deseada, utilizando hilo de sutura quirúrgica monofilamento. Cabe destacar que el deshidratado del tejido da como resultado niveles de consistencia y elasticidad adecuados, permitiendo llevar a cabo la sutura sin ninguna dificultad.
- 15 C. Construcción en laboratorio de sustitutos tisulares de colágeno mediante ingeniería tisular.
- 1- Generación de sustitutos del estroma tisular con células estromales inmersas en su interior. Para preparar 20 ml de sustituto estromal:
- 20 - Tomar 17,62 ml de colágeno líquido concentrado a 6,4 mg/ml; añadir 1,45 ml de PBS 10X y ajustar el pH a 7,4±0,2 mediante la adición de aproximadamente 180 µl de NaOH. Para elevar el pH se suele utilizar NaOH a una concentración de entre 0,1 y 1 M, aunque también pueden utilizarse otros productos. Mezclar mediante agitación suave y mantener en hielo para impedir la gelificación prematura.
- 25 - Añadir 150.000 células estromales previamente cultivadas y resuspendidas en 750 µl de medio de cultivo DMEM.
- Dividir en alícuotas lo antes posible en insertos porosos de cultivo celular o en placas de Petri estériles.
- Dejar polimerizar en reposo durante al menos 30 min en una incubadora a 37 °C.
- 2- Desarrollo de una capa de epitelio en la superficie del sustituto estromal mediante subcultivo de las células epiteliales de la mucosa oral sobre el sustituto estromal. Cubrir con medio de cultivo específico para células epiteliales.
- 30 3- Mantener en una incubadora a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 % en ambiente húmedo siguiendo protocolos estándar de cultivo celular. Los medios de cultivo se renuevan cada 3 días hasta que las células epiteliales alcanzan la confluencia en la superficie del sustituto estromal (alrededor de una semana).
- 35 4- Exponer la superficie epitelial al aire (técnica aire líquido) manteniendo el sustituto estromal sumergido en medio de cultivo para promover la estratificación y la maduración del epitelio (alrededor de una semana).
- 5- Extraer el tejido artificial de la superficie de cultivo y proceder a su deshidratación parcial depositando el mismo sobre un papel de filtro estéril de 3-5 mm de espesor colocado sobre una superficie plana de vidrio estéril. Colocar un fragmento de tul o tela porosa de nylon esterilizada con alcohol al 70 % sobre la superficie del sustituto estromal para impedir que la capa epitelial del sustituto tisular se adhiera al papel de filtro. Tras ello, colocar un segundo papel de filtro estéril de 3-5 mm de grosor sobre el sustituto estromal cubierto por tela. Depositar un fragmento plano de vidrio estéril en su superficie y colocar un objeto de aproximadamente 250 g de peso sobre éste (Figura 1). Todo el proceso debe realizarse en una campana de flujo laminar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- 40 6- Una vez deshidratado el tejido, cortarlo a medida dándole la forma deseada, utilizando hilo de sutura quirúrgica monofilamento.
- 50 Evaluación de los productos de mucosa oral humana artificial (Figura 7):
- Se llevó a cabo la evaluación de los productos obtenidos según el protocolo anterior. Las concentraciones de fibrina, agarosa y colágeno para cada uno de los productos elaborados se indican a continuación:
- 55 A.- fibrina (1,25 g/l), agarosa (0,5 g/l) y colágeno (2,8 g/l).
- B.- fibrina (0,6 g/l), agarosa (0,25 g/l) y colágeno (3,8 g/l).
- 60 C.- fibrina (1,9 g/l), agarosa (0,75 g/l) y colágeno (1,9 g/l).
- D.- fibrina (0 g/l), agarosa (0 g/l) y colágeno (5,6 g/l).
- 1) Análisis microscópico de los tejidos artificiales (control de calidad histológico) (Figura 7A).
- 65 El análisis microscópico reveló que los tejidos artificiales generados mediante ingeniería tisular eran estructuralmente similares a los tejidos naturales utilizados como control. En concreto, se pudo apreciar un estroma

compuesto por numerosas fibras entre las que se disponían las células estromales, mostrando niveles adecuados de proliferación celular. En comparación con otros modelos previamente descritos (especialmente, los modelos de fibrina y de fibrina con agarosa), los tejidos de fibrina, agarosa y colágeno presentan mayor densidad fibrilar a nivel del estroma. Todo ello sugiere que los productos tisulares construidos basándose en el protocolo expuesto anteriormente, son compatibles con los tejidos humanos normales naturales.

2) Control de calidad reológico (Figura 7B).

El análisis de las propiedades biomecánicas de los productos tisulares construidos basándose en el protocolo expuesto anteriormente se realiza mediante un reómetro. Los resultados se muestran en la figura 7C y revelan que el mejor tejido es el producto A seguido del C, siendo el B muy similar al D (colágeno solo). Por tanto, el análisis realizado demostró una mejora del comportamiento viscoelástico y un esfuerzo umbral creciente según se aumenta la concentración de colágeno, y más elevado que el mostrado por los tejidos artificiales de colágeno.

Los datos presentados en estos ejemplos muestran que las propiedades físicas de los tejidos de fibrina, agarosa y colágeno son óptimas y similares a las de los tejidos humanos normales utilizados como control, lo que supone una mejora con respecto a los tejidos artificiales descritos con respecto a su utilización clínica.

#### **Ejemplo 8: Mejora de los biomateriales de fibrina-agarosa tras la aplicación de técnicas de estructuración.**

La aplicación de técnicas de nanoestructuración es capaz de modificar sustancialmente la estructura y el comportamiento de los biomateriales sometidos a este proceso. Los principales efectos de la nanoestructuración sobre el biomaterial de fibrina y agarosa al 0,1 % (concentración final preferida de la solicitud de patente) son los siguientes:

- Mejora significativa de las propiedades biomecánicas del tejido. Este aumento permite la manipulación del tejido nanoestructurado y supone una mejora sustancial y no esperada de las propiedades reológicas del biomaterial. Como se muestra en la figura 8, el esfuerzo umbral fue 3,8 veces superior en los tejidos nanoestructurados respecto a los no nanoestructurados (16,2 y 4,23 Pascales, respectivamente). En la misma línea, el módulo viscoso  $G''$  de las muestras sometidas a nanoestructuración fue 5,26 veces mayor respecto a las muestras no nanoestructuradas (19,3 y 3,67 Pa, respectivamente) (figura 9). Estos datos indican que la resistencia de los biomateriales nanoestructurados es muy superior a la de los tejidos no nanoestructurados.

Del mismo modo, el módulo elástico  $G'$  de los tejidos nanoestructurados fue 5,55 veces mayor (figura 10) respecto a los biomateriales naturales no nanoestructurados (152 y 27,4 Pa, respectivamente), lo cual significa que estos tejidos presentan niveles de elasticidad significativamente más altos.

Todos estos fenómenos son muy significativos y evidentemente no dependen de la concentración de agua en el biomaterial, sino de las reacciones internas generadas en el biomaterial como consecuencia del proceso de nanoestructuración.

- Mejora sustancial de la manipulabilidad del tejido nanoestructurado, lo cual permitió su manipulación quirúrgica, la sutura al lecho receptor y el implante en animales de experimentación. Es importante destacar que los tejidos no nanoestructurados fueron significativamente más difíciles de manipular, tendiendo a la ruptura y dificultando notablemente la sutura y el implante clínico. Esta mejora es muy significativa y no puede explicarse simplemente por la disminución de la concentración de agua en el biomaterial, sino por la formación de estructuras tridimensionales de enlace entre las distintas fibras de fibrina y agarosa, modificándose de forma inesperada las propiedades del biomaterial.

- Mejora significativa de la transparencia de los tejidos sometidos a nanoestructuración. La transparencia de los biomateriales no nanoestructurados de fibrina-agarosa 0,1 %, medida como porcentaje de transmitancia del espectro de la luz visible (aproximadamente, de 400 a 700 nm), alcanzó niveles del 90-94 %, dependiendo de la longitud de onda considerada (media 92 %), mientras que los biomateriales no nanoestructurados presentaron una transmitancia del 87-90 % (media 88,5 %) (figura 10). Existe por tanto una mejor transparencia (mayor transmitancia de la luz visible) en los biomateriales sometidos al proceso de nanoestructuración. Al igual que en los casos anteriores, este fenómeno es el resultado de un proceso complejo de reacciones químicas y físicas en la estructura interna del biomaterial y no es en absoluto previsible encontrar una mejora de la transparencia, puesto que los tejidos nanoestructurados son más densos y más pobres en contenido de agua que los tejidos no nanoestructurados.

- Resultado clínico una vez implantados en animales de laboratorio. El implante de los biomateriales sometidos a nanoestructuración ha demostrado ser más efectivo desde un punto de vista clínico que el de los biomateriales no nanoestructurados. Este hecho, que no es previsible de antemano, habría que relacionarlo, por un lado, con la mayor eficacia del implante clínico debido a las adecuadas propiedades biomecánicas del biomaterial y, por otro lado, al hecho de que los biomateriales sometidos a nanoestructuración presentan una mayor densidad de fibras por  $\text{mm}^2$  y, por tanto, presentan remodelación más lenta por parte del organismo receptor.

**REIVINDICACIONES**

1. Método *in vitro* de preparación de un tejido artificial que comprende:
  - 5 a) añadir una composición que comprende fibrinógeno a una muestra de células aisladas,
  - b) añadir un agente antifibrinolítico al producto resultante de la etapa (a),
  - c) añadir, al menos, un factor de coagulación, una fuente de calcio, trombina, o cualquier combinación de los anteriores al producto resultante de la etapa (b),
  - d) añadir una composición de un polisacárido al producto resultante de la etapa (c),
  - 10 e) cultivar células aisladas en o sobre el producto resultante de la etapa (d), e
  - f) inducir la nanoestructuración del producto resultante de la etapa (e), comprendiendo dicha inducción de nanoestructuración la deshidratación y/o compresión mecánica del producto resultante de la etapa (e), y siendo el polisacárido de la etapa (d) agarosa.
- 15 2. El método según la reivindicación 1, en el que las células de la etapa (a) son fibroblastos o queratocitos.
3. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que entre las etapas (b) y (c) comprende adicionalmente una etapa (etapa b2) en la que se añade una proteína.
- 20 4. El método según la reivindicación 3, en el que la proteína añadida en la etapa (b2) es fibronectina.
5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que entre las etapas (d) y (e), comprende una etapa (b2) que comprende la adición, al producto resultante de la etapa (d), de una composición que comprende una proteína.
- 25 6. El método según la reivindicación 5, en el que la proteína añadida en la etapa (d2) es colágeno.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que las células de la etapa (e) comprenden células madre de cordón umbilical.
- 30 8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que las células de la etapa (e) comprenden células epiteliales.
9. El método según la reivindicación 1, en el que la deshidratación del producto resultante de la etapa (e), comprende un método seleccionado de la lista que comprende: drenaje, evaporación, succión, presión capilar, ósmosis o electroósmosis.
- 35 10. El método según la reivindicación 9, en el que la deshidratación del producto resultante de la etapa (e) mediante presión capilar, comprende la aplicación de un material absorbente sobre el producto resultante de la etapa (e).
- 40 11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la compresión mecánica de la etapa (f) comprende un método seleccionado de la lista que comprende: aplicación de una carga estática, aplicación de un hidráulico, aplicación de una leva, aplicación de uno o más rodillos, aplicación de un globo, extrusión o centrifugación.
- 45 12. El método según la reivindicación 11, en el que la aplicación de una carga estática de la etapa (f) comprende la colocación de un peso sobre el producto resultante de la etapa (e).
- 50 13. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que entre la etapa (e) y la etapa (f) hay una etapa adicional en la que el producto resultante de la etapa (e) se expone al aire.
14. Un tejido artificial obtenible por el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
- 55 15. El uso del tejido artificial según la reivindicación 14, para la evaluación de un producto farmacológico y/o químico.
16. El tejido artificial según la reivindicación 14 para su uso en medicina.
- 60 17. El tejido artificial según la reivindicación 14 para su uso en incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano enfermo o dañado.
18. El tejido artificial para su uso según la reivindicación 17, en la que el tejido o el órgano dañado se selecciona de la lista que comprende: piel, vejiga, uretra, córnea, mucosa, conjuntiva, pared abdominal, conjuntiva, tímpano, faringe, laringe, intestino, peritoneo, ligamento, tendón, hueso, meninge o vagina.
- 65 19. Una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial según la reivindicación 14.

FIGURA 1

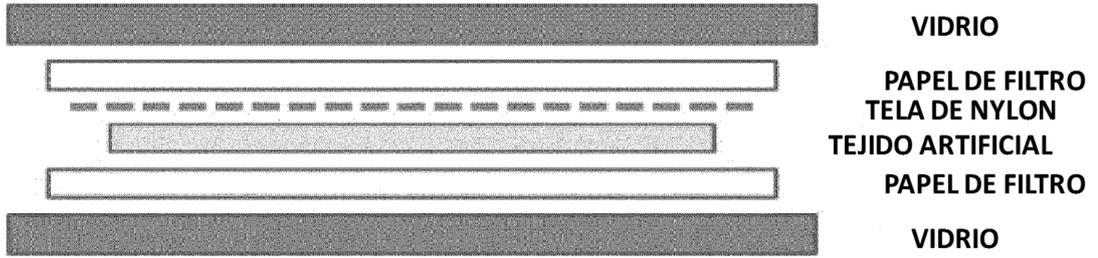


FIGURA 2A

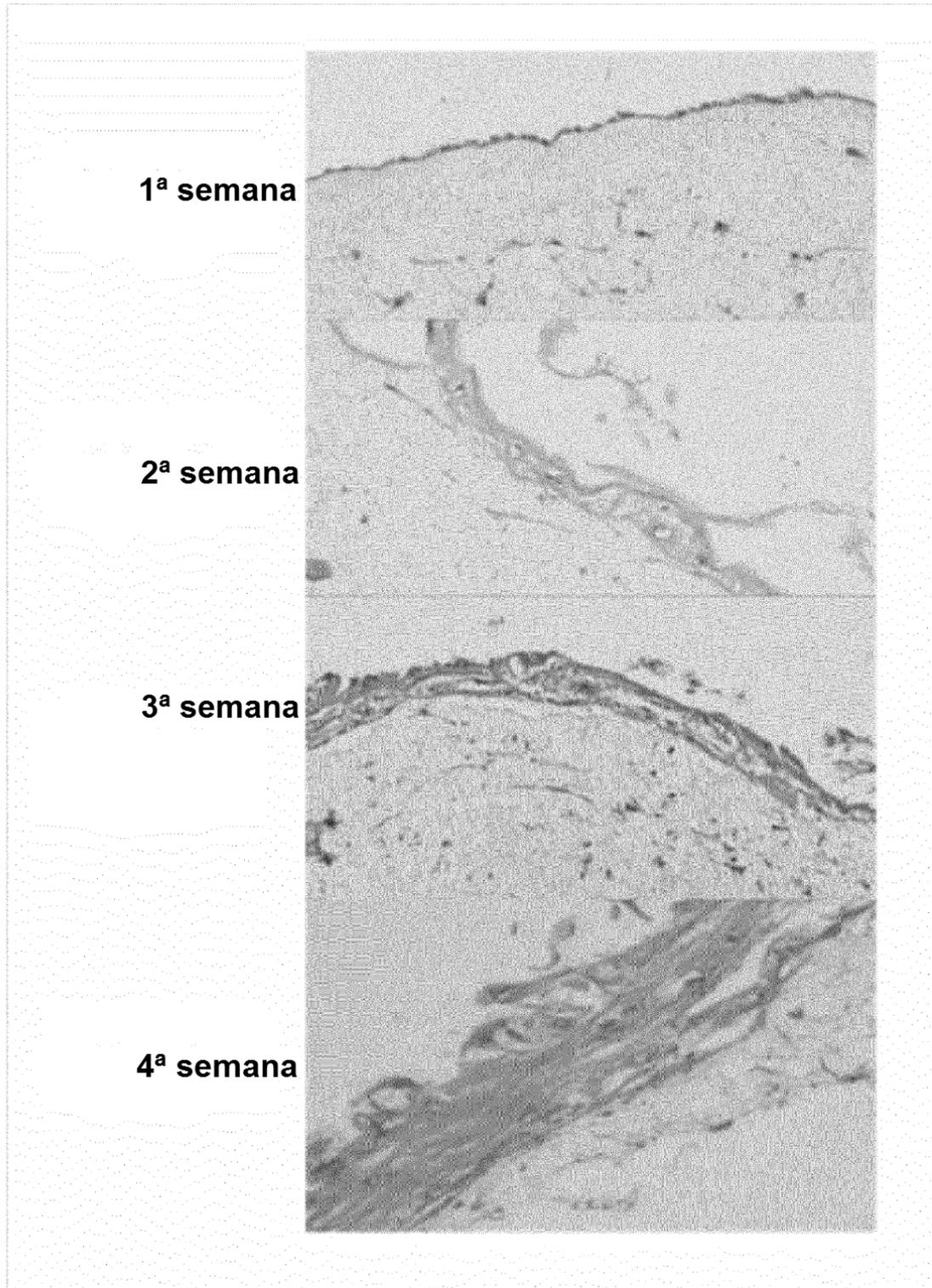


Figura 2B

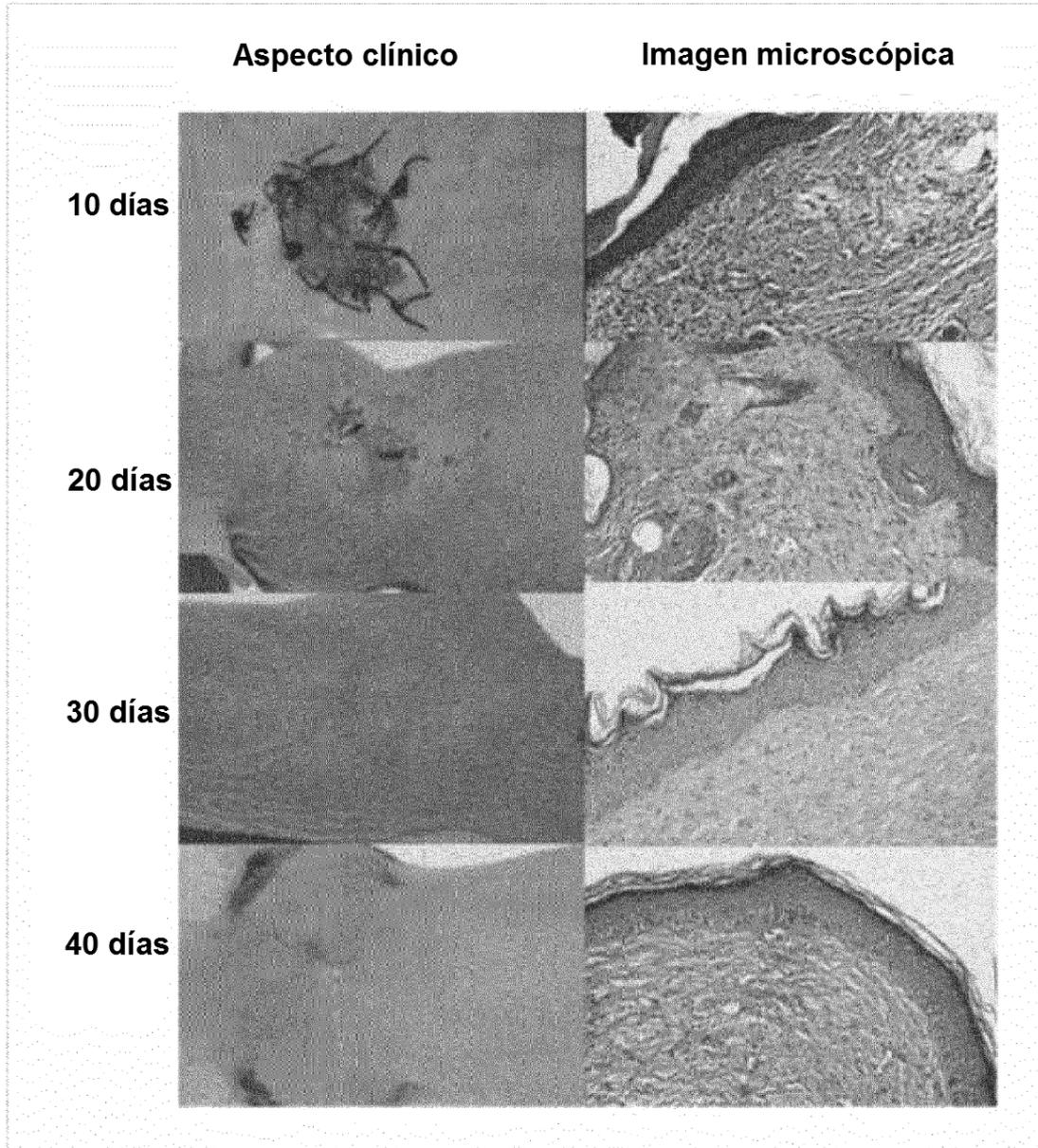


Figura 2C

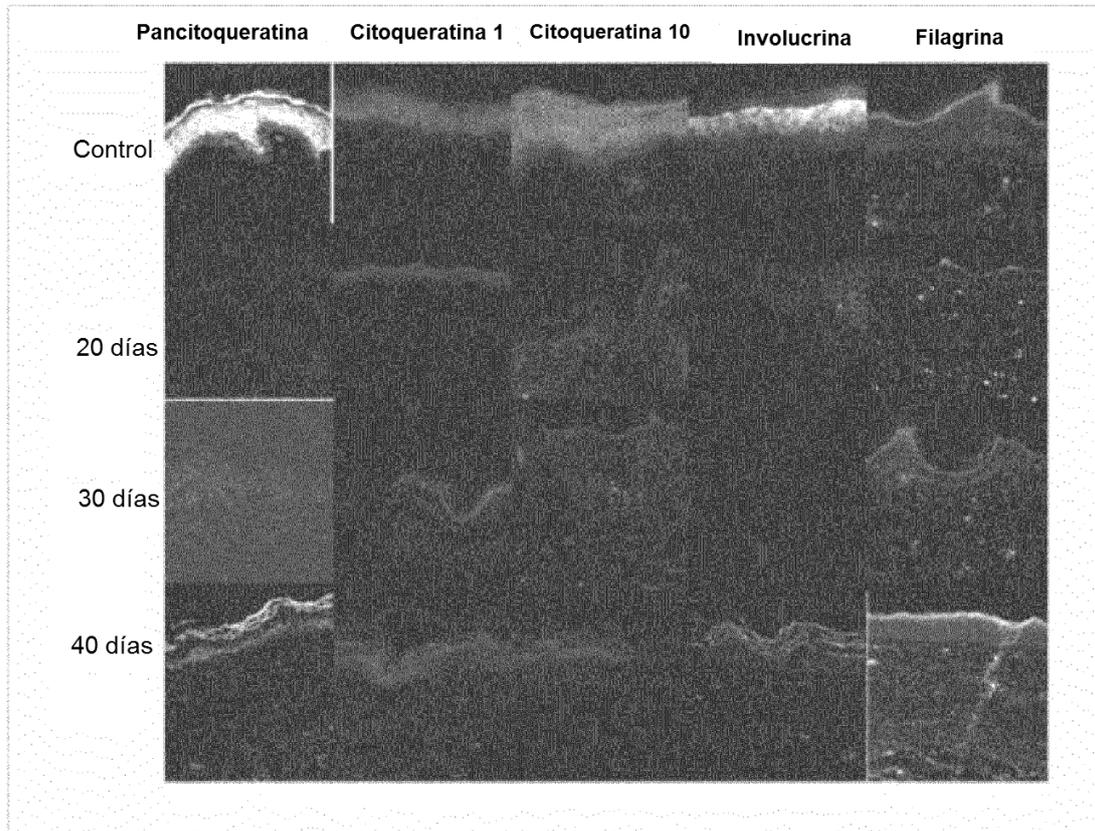


Figura 3A

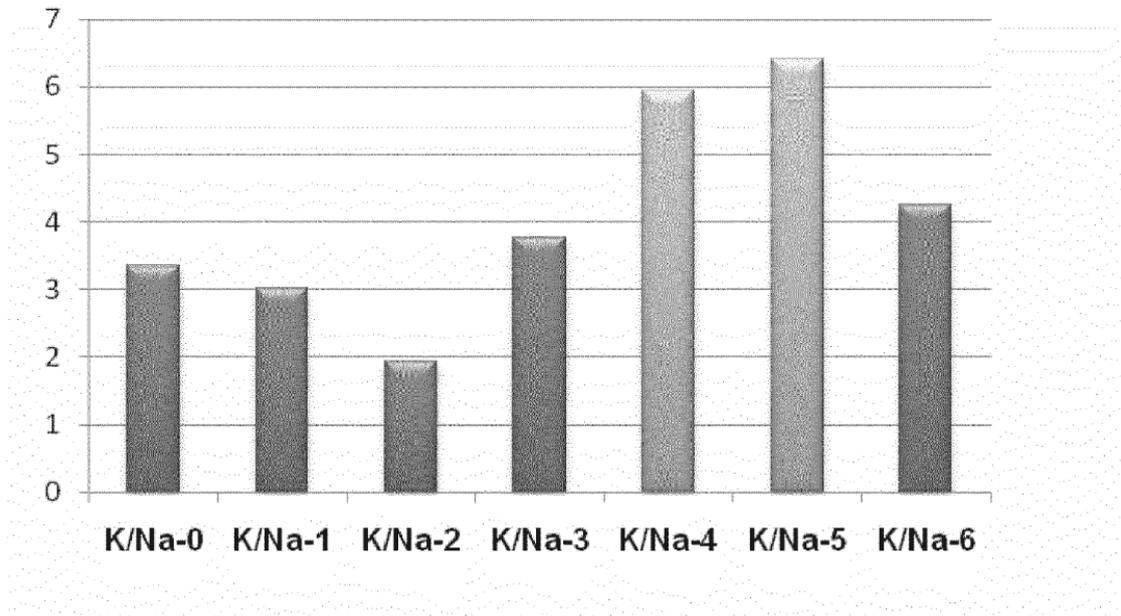


Figura 3B

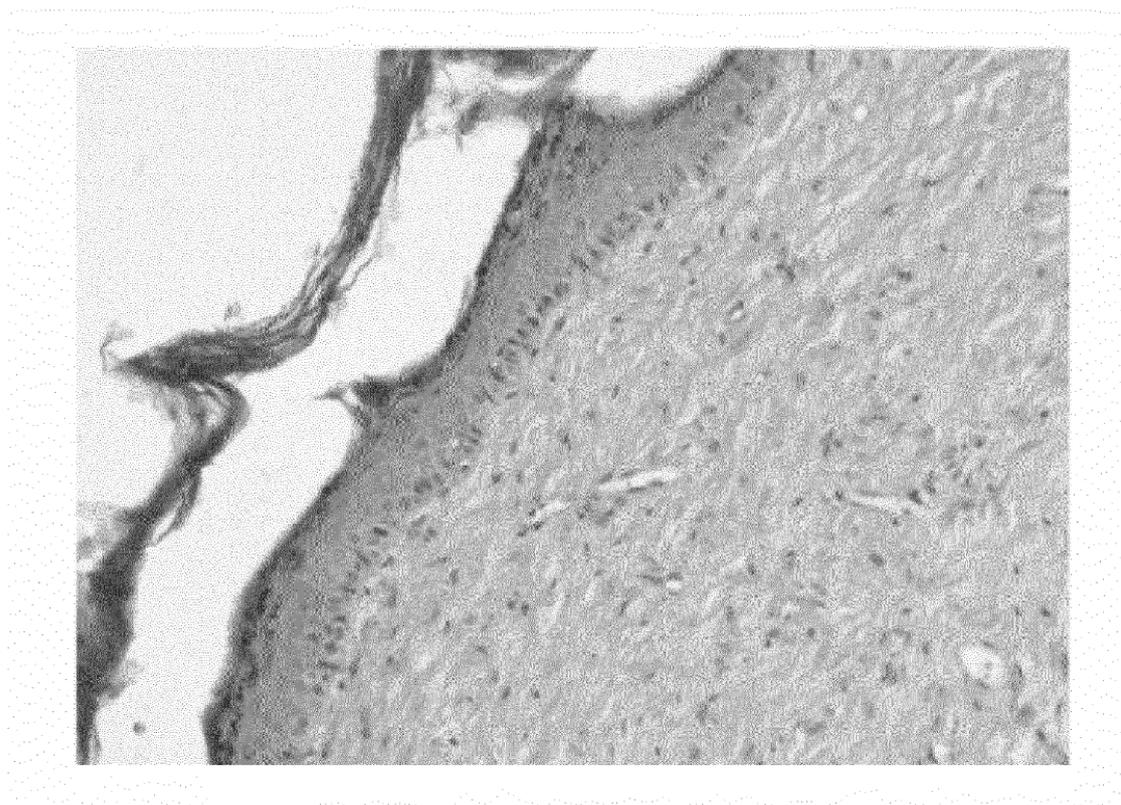


Figura 3C

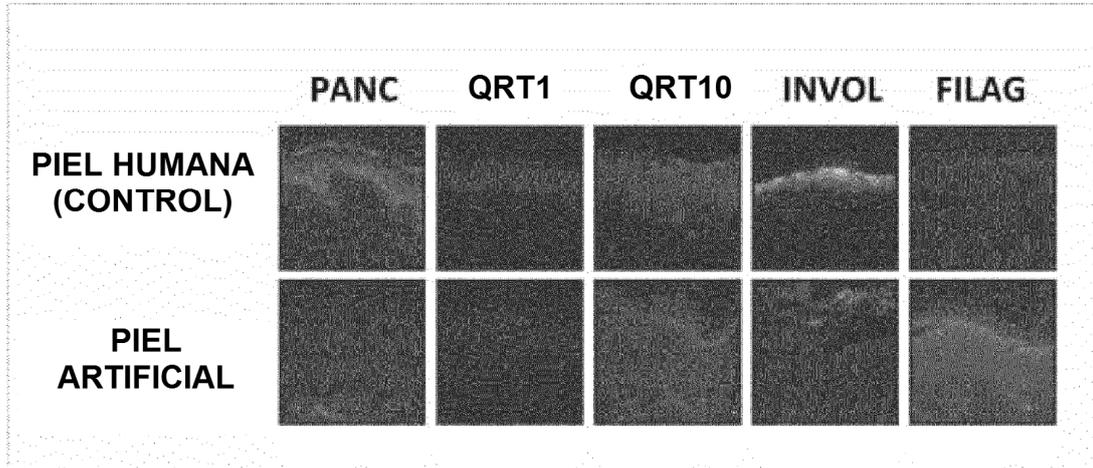


Figura 4A

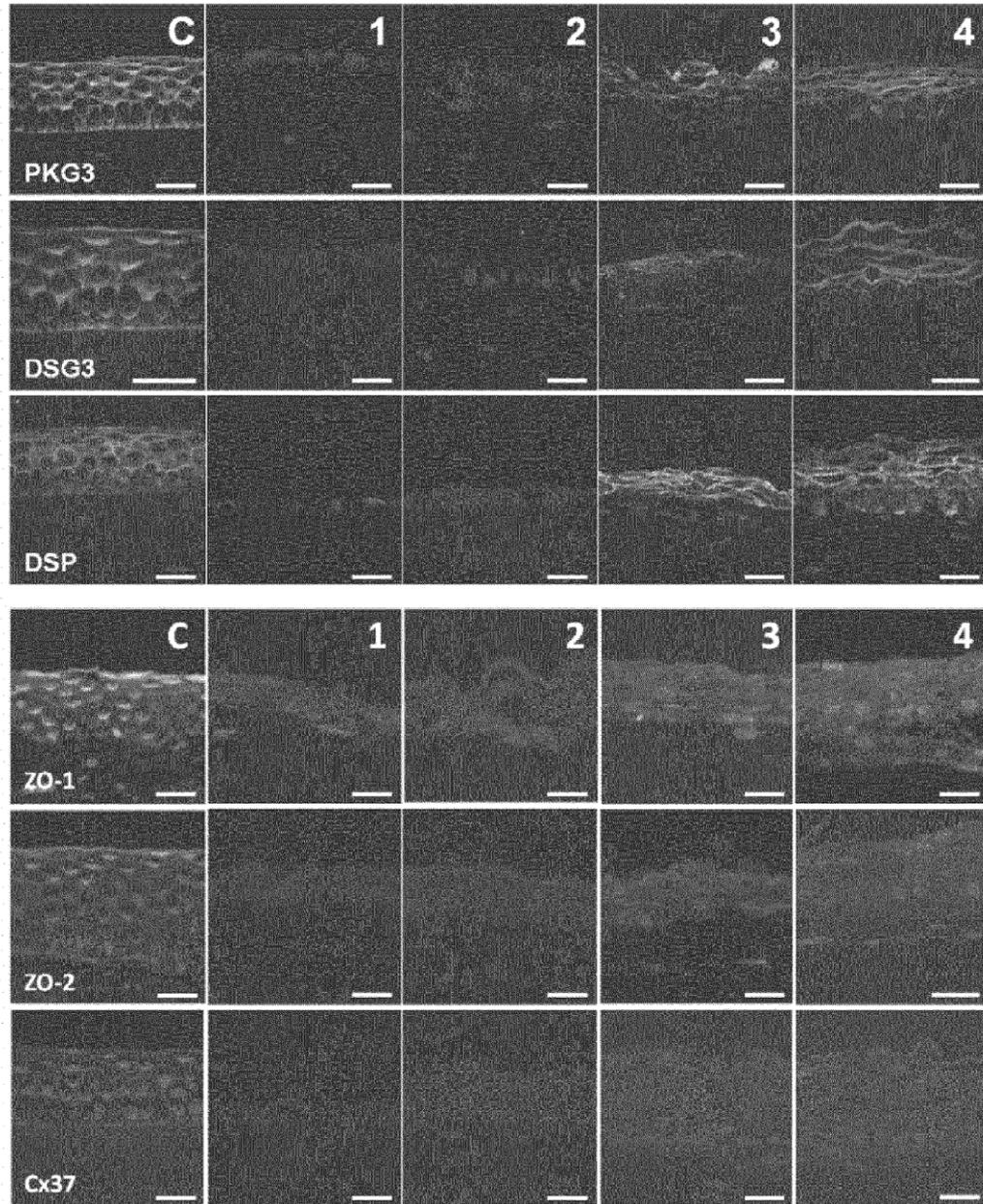


Figura 4B

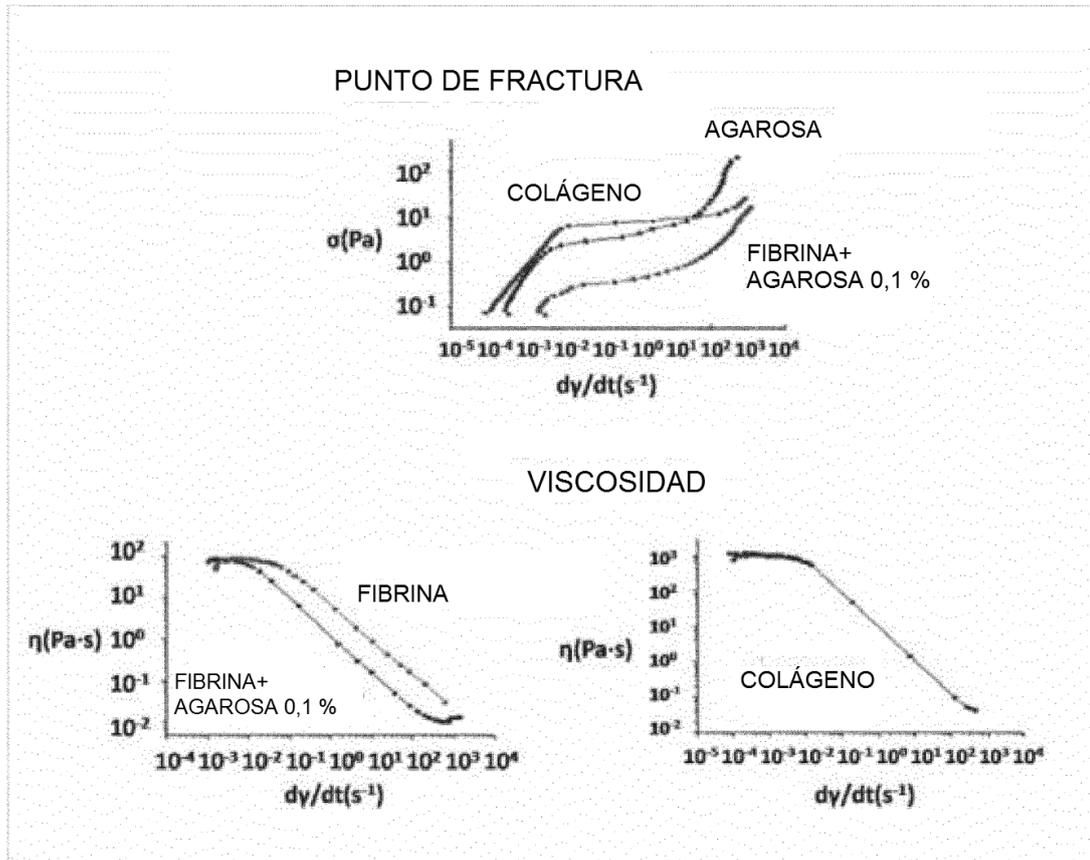


Figura 4C

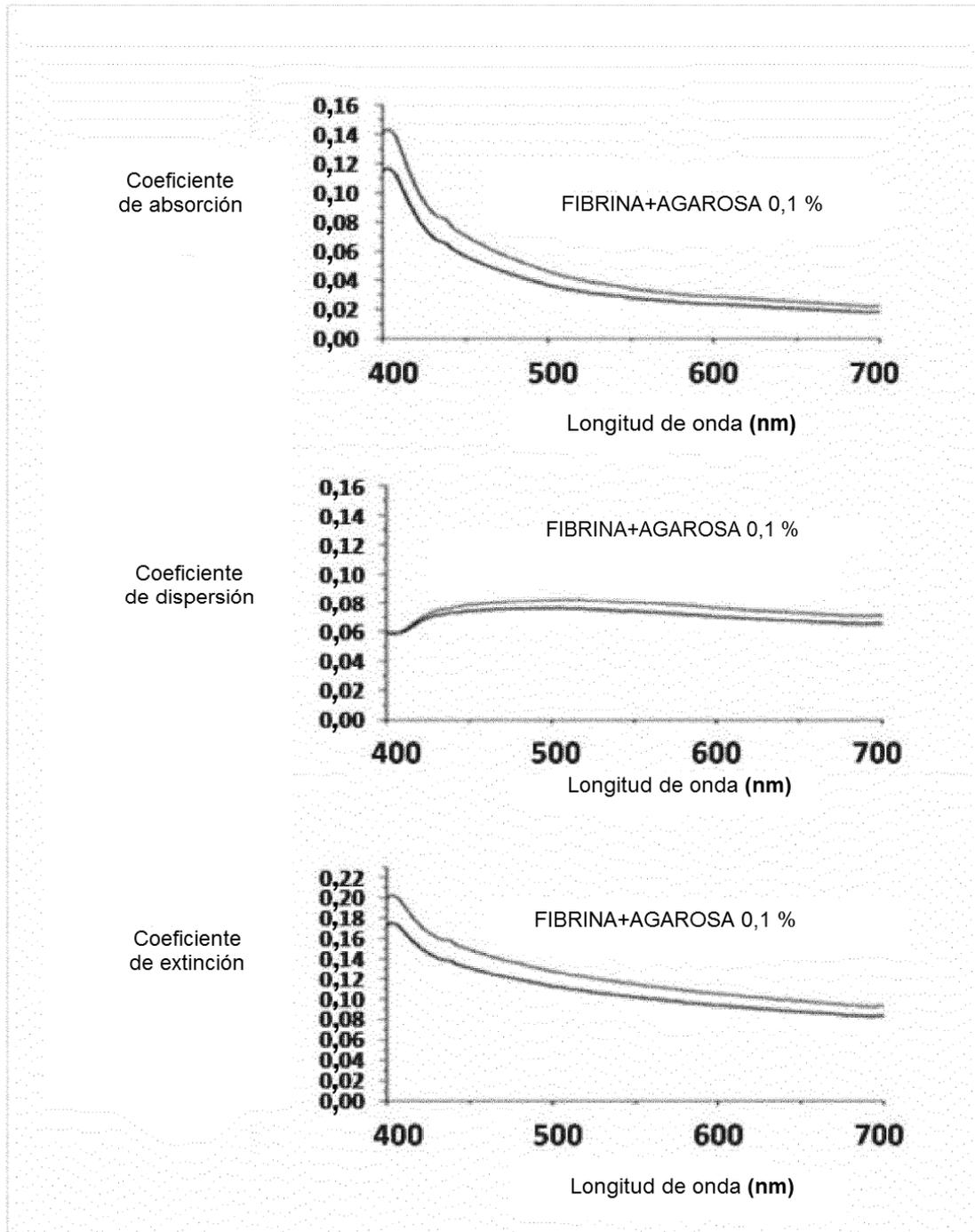


Figura 4D

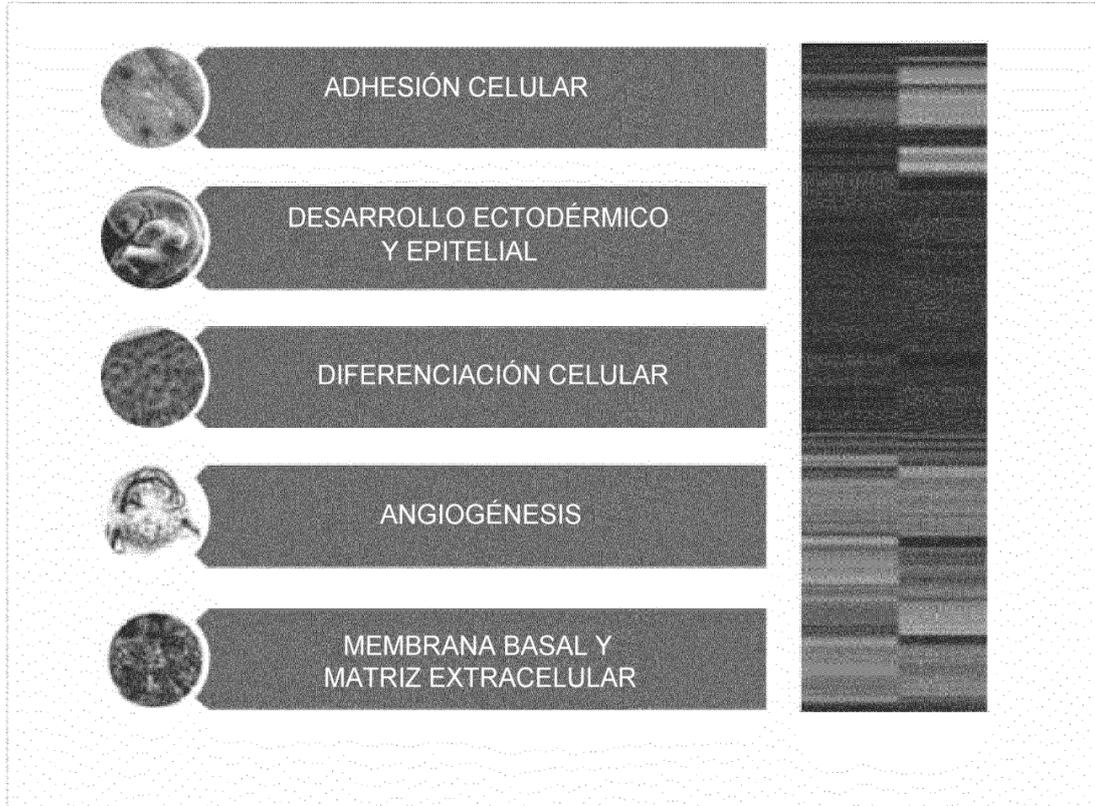


Figura 4E

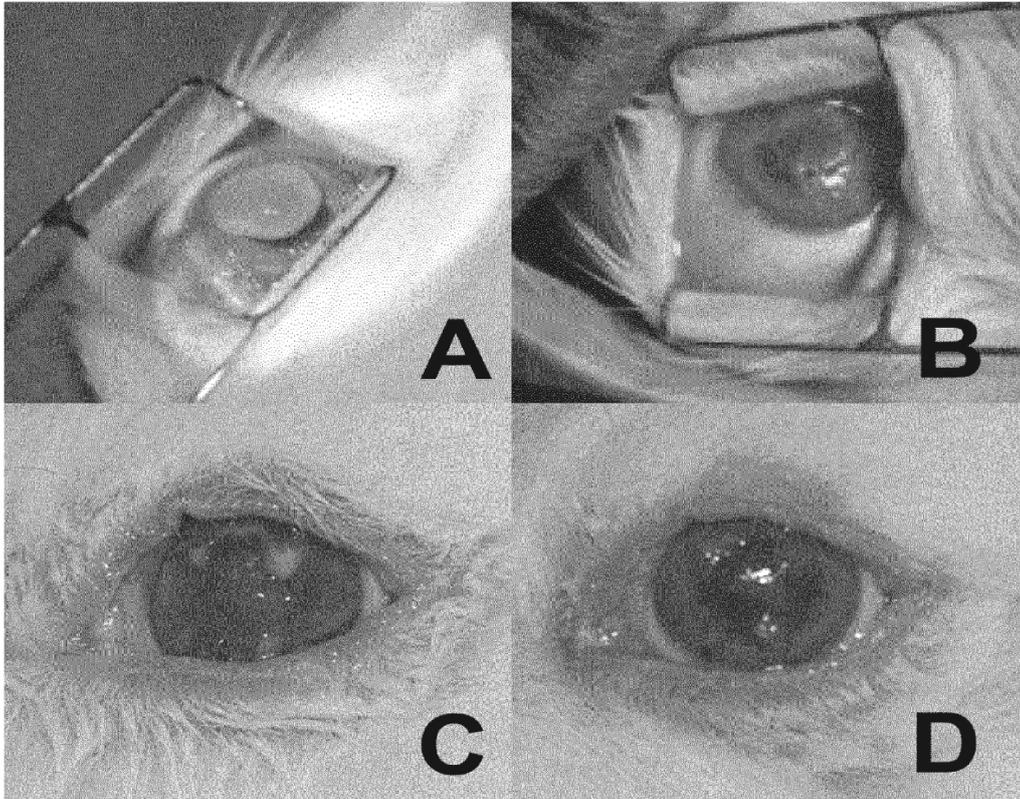


Figura 5A

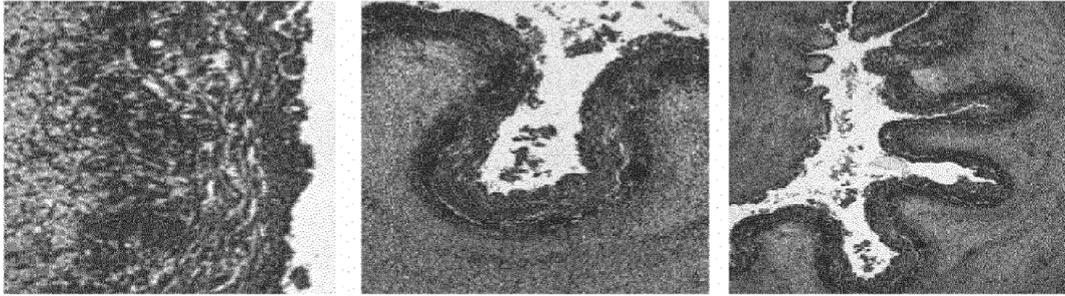


Figura 5B

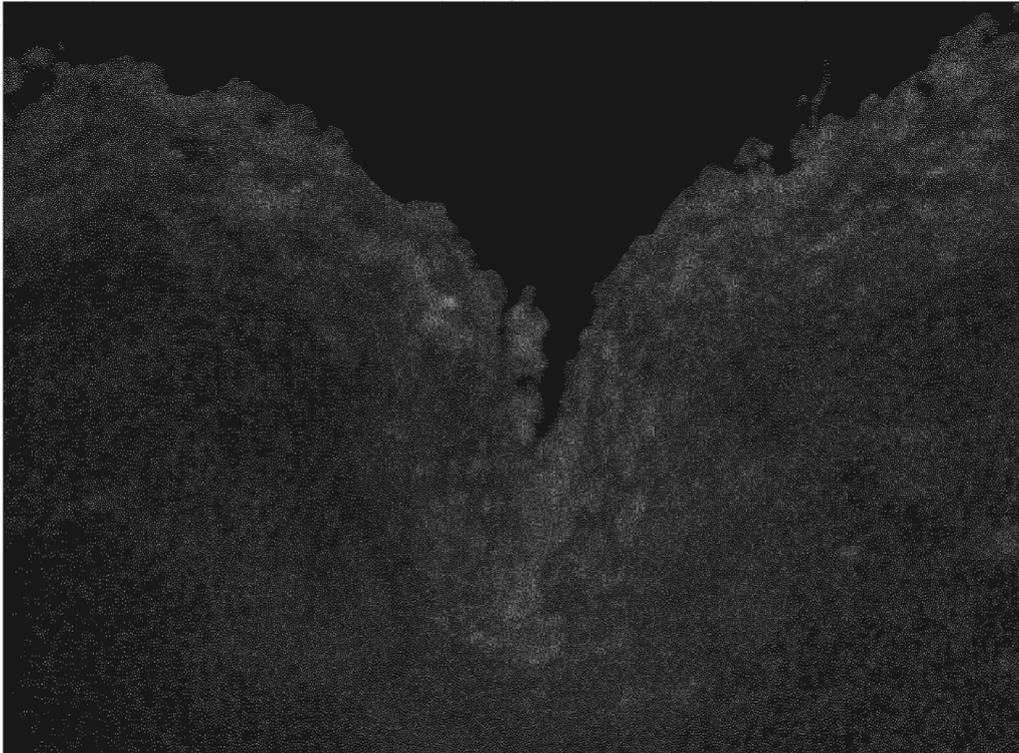


Figura 6A

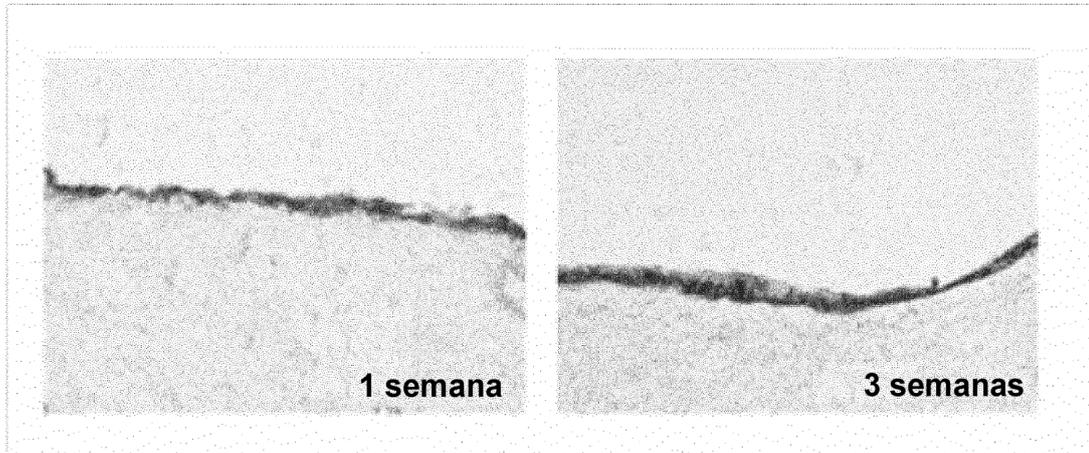


Figura 6B

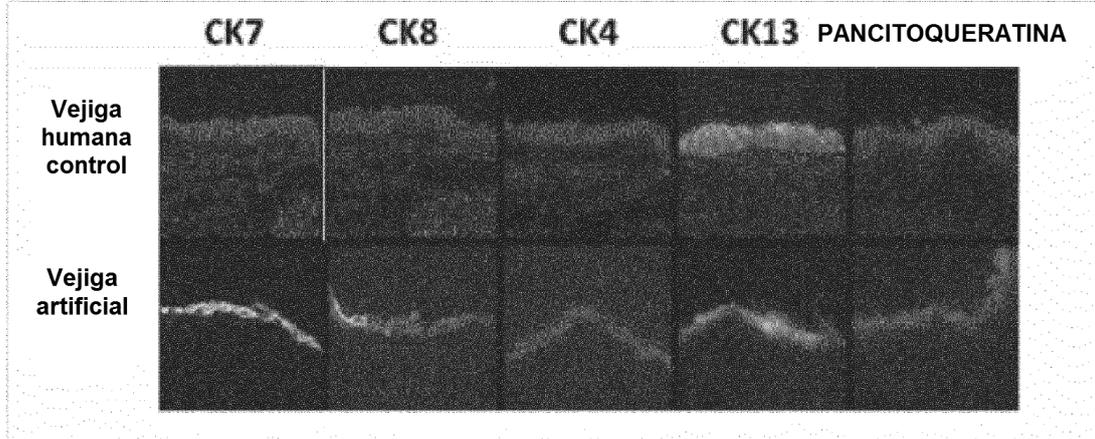


Figura 7A

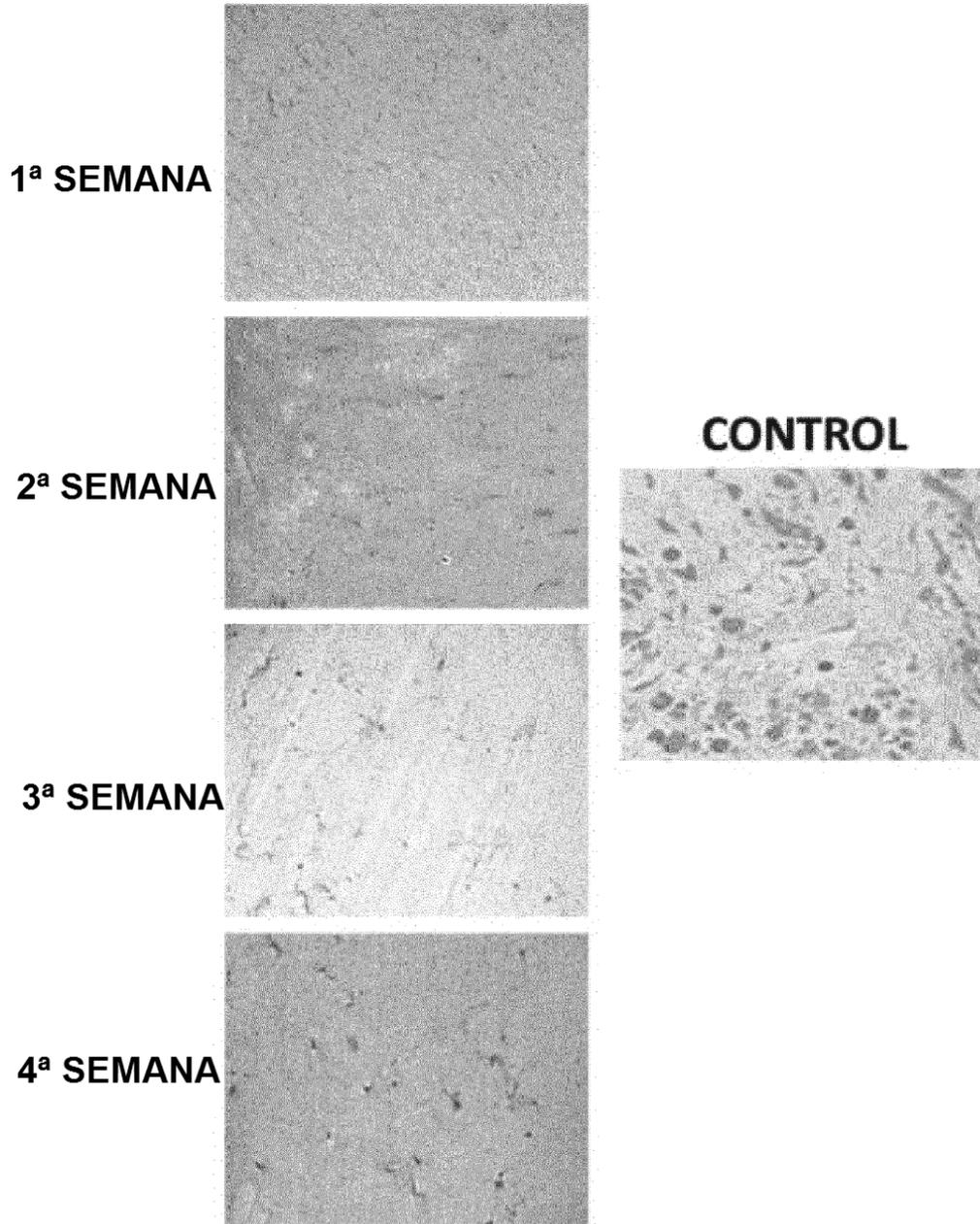


Figura 7B

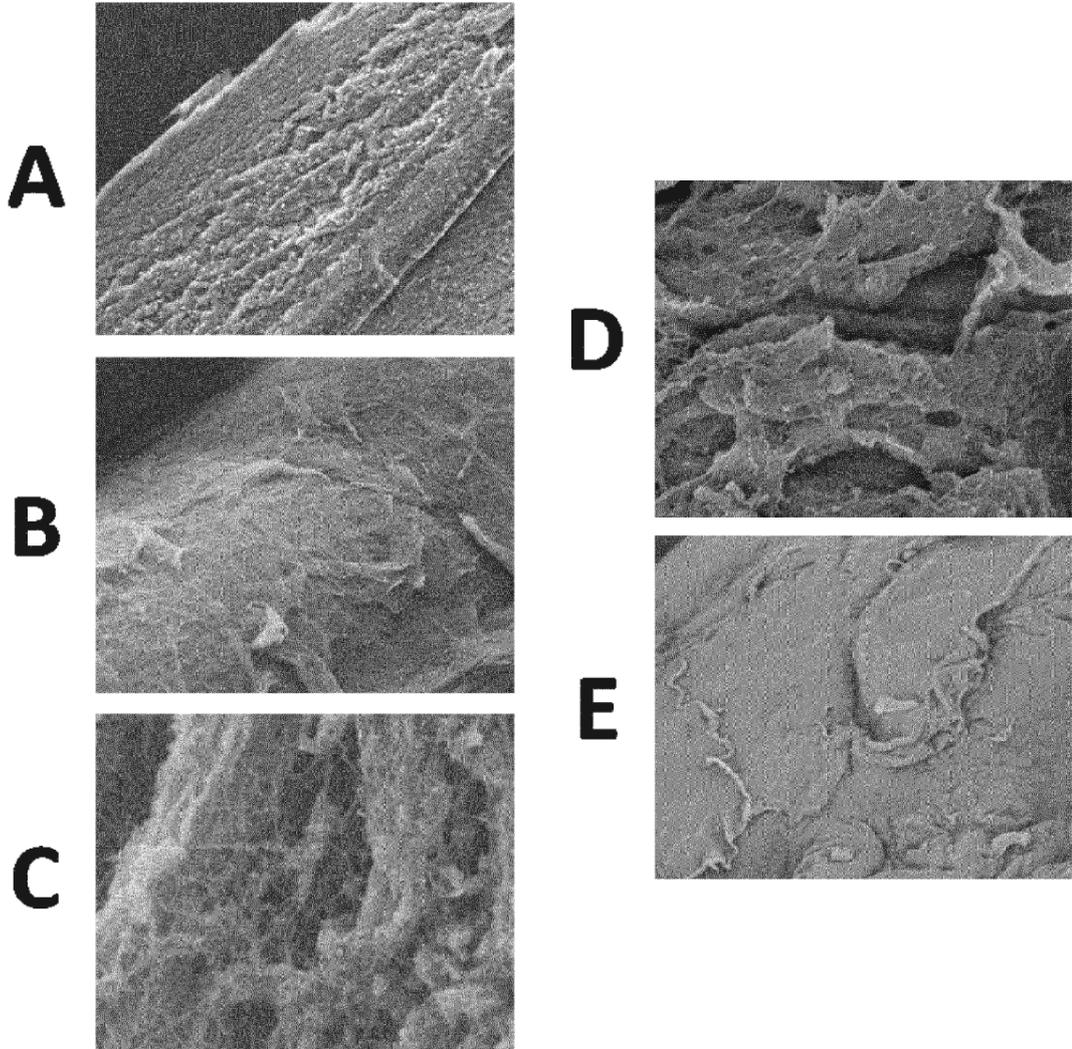


Figura 7C

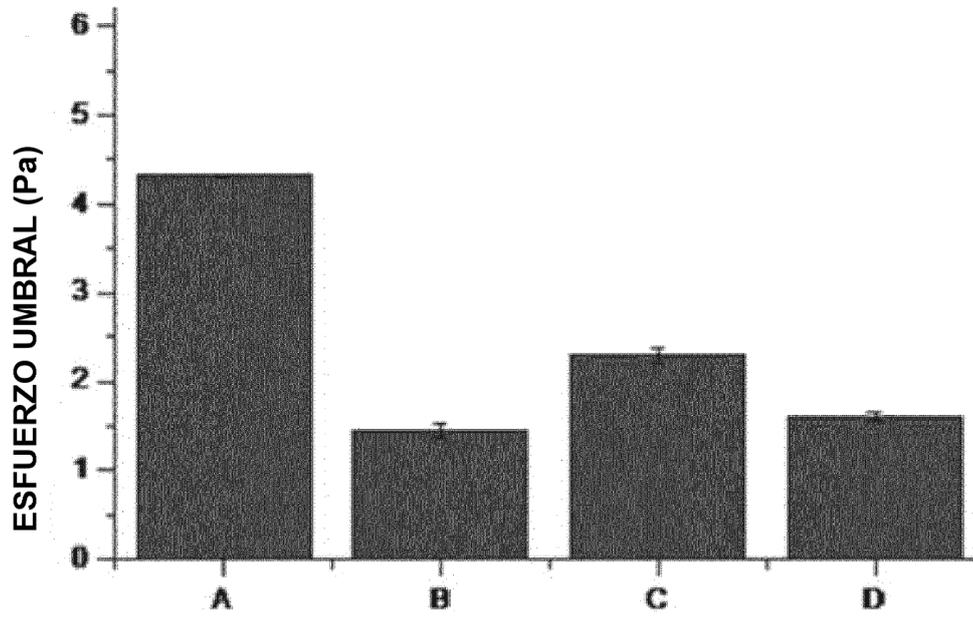


Figura 8

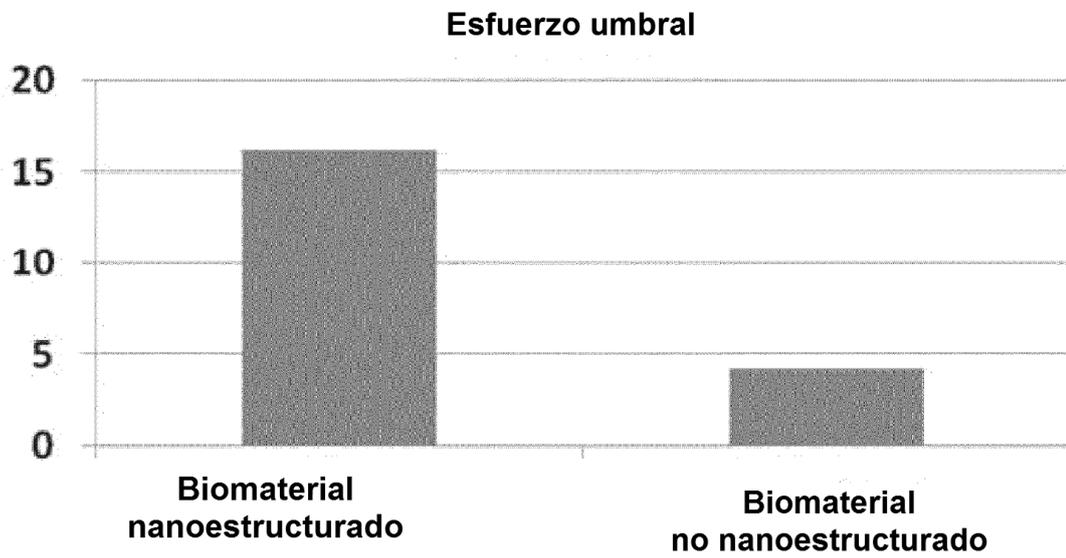


Figura 9

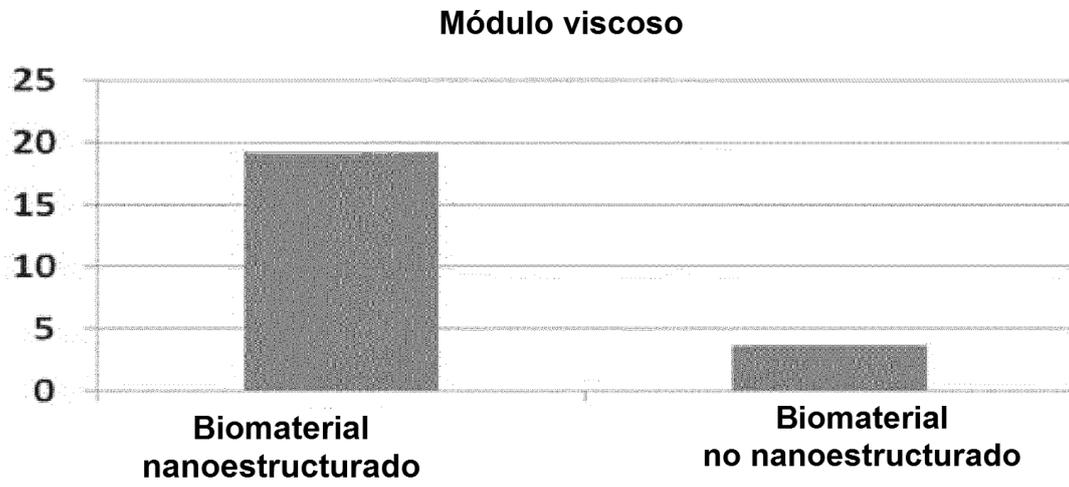


Figura 10

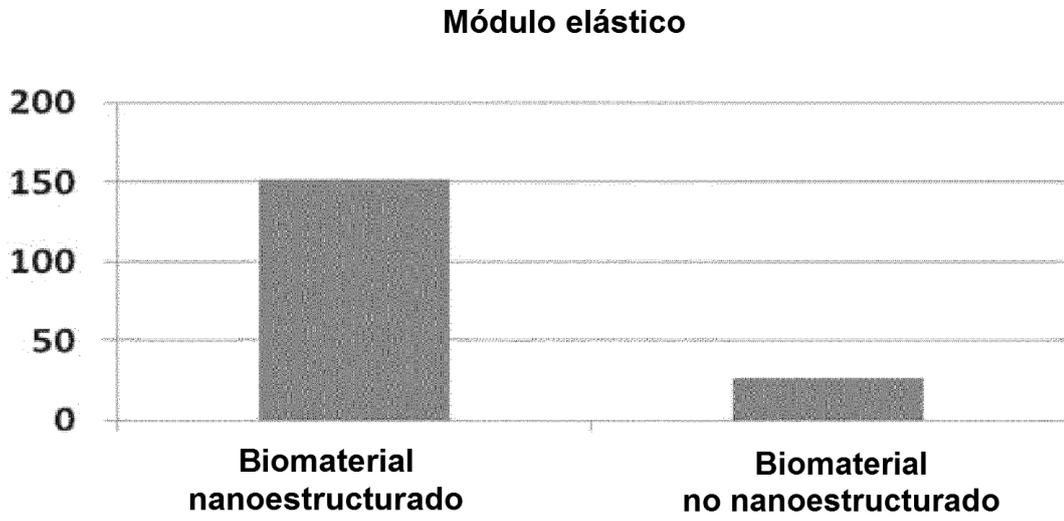


Figura 11

