

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 816**

51 Int. Cl.:

A61L 27/36	(2006.01)
A61L 27/60	(2006.01)
C12N 5/071	(2010.01)
C07K 14/78	(2006.01)
C12N 1/06	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.02.2011 PCT/IB2011/001538**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2011 WO11132089**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2011 E 11771666 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.01.2019 EP 2538988**

54 Título: **Métodos para la descelularización de tejidos**

30 Prioridad:

26.02.2010 US 308872 P

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

16.07.2019

73 Titular/es:

**DECELL TECHNOLOGIES INC. (100.0%)
1344 Summer Street
Halifax, Nova Scotia B3H 0A8, CA**

72 Inventor/es:

GRATZER, PAUL, FRANK

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 719 816 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

Métodos para la descelularización de tejidos

Campo de la invención

La descripción se refiere en términos generales al campo de la bioingeniería y, en concreto, a los métodos para producir tejidos descelularizados, esterilizados y bioprotésicos.

Antecedentes

El trasplante de tejidos y órganos es un campo terapéutico que crece con rapidez como resultado de la mejora de los procedimientos quirúrgicos, de los avances en los fármacos inmunodepresores y del incremento del conocimiento de la interacción entre injerto y huésped. Hay numerosas investigaciones en marcha dirigidas a la manipulación genética que produzca mejores injertos de tejidos trasplantables, aunque, por lo general, se cree en la industria que todavía están por llegar los implantes ideales.

Se ha explorado el uso de armazones tisulares descelularizados como una posibilidad para la ingeniería de tejidos, aunque las estrategias actuales han resultado ser inadecuadas. Las referencias de interés incluyen la patente de los EE. UU. n.º 6 743 574; la patente de los EE. UU. n.º 5 336 616; Gratzner et al., *Tissue Engineering*, 12 (10): 2975-2983 (2006); Woods et al., *Biomaterials*, 26: 7339-7349 (2005); Williams et al., *Acta Biomaterialia*, 5: 993-1005 (2009); Liao et al., *Biomaterials*, 29: 1065-1074 (2008); Wilson et al., *Ann Thorac Surg*, 60: S353-S358 (1995); publicación de solicitud de patente internacional en el marco del PCT WO 2006/101885; la patente de los EE. UU. n.º 7 318 998; Kitagawa et al., *J Med. Invest.* 48 (3-4): 123-132 (2001); Kearney, *Clin. Dermatol.*, 23: 357-364 (2005); Azar, *Clin Sport Med*, 28: 191-201 (2009); y Simon et al., *Eur. J. Cardiothorac. Surg*, 23: 1002-1006 (2003).

La patente de los EE. UU. 20008/306610 describe un método de procesamiento de tejidos para hacerlos idóneos para la implantación. El espécimen de tejido es, o procede de, un tejido tal como cartílago, ligamento o tendón. Los tejidos se hacen sustancialmente acelulares y sustancialmente no inmunógenos. El procesamiento es mediante la lisis de al menos una célula, lo que da lugar a la producción de residuos celulares que realzan la permeabilidad de la MEC, con lo que se degradan los residuos celulares y se retiran los residuos celulares degradados. En una realización, la lisis celular se produce antes de realzar la permeabilidad de la MEC al exponer el tejido a una solución tamponante que tiene una osmolaridad que es inferior a la fisiológica (a saber, un tampón hipotónico). El tampón hipotónico puede contener diferentes sales y/o componentes tamponantes, tales como tris(hidroximetil)aminometano (TRIS). La lisis celular por tratamiento químico incluye la digestión enzimática y expone el tejido a los reactivos que solubilizan los lípidos y/o las membranas celulares, que incluyen detergentes, por ejemplo, Triton X-100. En una realización, la lisis celular se produce en presencia de al menos un inhibidor de proteasas, p. ej., fluoruro de fenilmetilo o EDTA. La permeabilidad de la MEC se puede incrementar con el uso de uno o varios agentes, tales como un tampón hipertónico, un detergente y/o una enzima. El residuo celular que es resultado de la lisis se degrada o se retira. La degradación se produce por exposición del tejido a una enzima (p. ej., nucleasa). Después se dan uno o varios tratamientos para degradar el residuo celular, se lava el tejido para retirar el residuo con una solución que contiene SDS en el tampón de TRIS a 50 mM y, a continuación, se trata con una solución que contiene antibiótico y/o un alcohol.

A pesar de los avances importantes en el campo de la ingeniería biomédica, el trasplante de tejidos moderno permanece asociado a complicaciones que incluyen inflamación, degradación, fibrosis, contractura, calcificación (endurecimiento), oclusión y/o rechazo. Además, las tecnologías existentes para producir los armazones tisulares descelularizados han fracasado a la hora de reducir lo suficiente el número de células del tejido hasta un valor adecuado. Por lo tanto, en la técnica se necesitan métodos para producir tejidos que eviten o reduzcan los inconvenientes descritos más arriba y que, por lo tanto, tengan una usabilidad mayor a corto y largo plazo. En la técnica también hay una necesidad adicional de métodos para producir tejidos descelularizados estériles.

Compendio

En la presente memoria se da a conocer un método para producir un tejido bioprotésico para humano de acuerdo con la reivindicación 1. En algunas realizaciones, el método comprende además poner en contacto uno o varios de los tejidos con una solución isotónica desde el punto de vista fisiológico.

En algunas realizaciones, el tejido de humano es tejido cutáneo de humano, en donde la solución hipotónica comprende el tampón de Tris a 10 mM, en donde la primera solución de tensioactivo comprende Triton X-100® (octilfenoxipolietoxietanol) al 1% (v/v), en donde la solución de enzimas de tipo nucleasa comprende ARNasa y ADNasa, en donde la solución de limpieza comprende fosfato de tri-n-butilo (TnBP) al 1% (v/v), en donde la solución del agente reductor de biocarga comprende ácido peracético al 1% (v/v), en donde cada etapa del método se realiza por separado con respecto a las otras etapas del método, y en donde cada etapa del método va seguida inmediatamente por una etapa de enjuague antes de comenzar la siguiente etapa del método. En algunas realizaciones, el método comprende además el tratamiento con ultrasonidos de uno o varios de los tejidos.

En algunas realizaciones, una o varias de las soluciones comprende además un inhibidor de proteasas. En algunas realizaciones, el inhibidor de proteasas es un inhibidor de serina proteasas, un inhibidor de metaloproteasas, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el inhibidor de proteasas es el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). En algunas realizaciones, el inhibidor de proteasas es fluoruro de fenilmetanosulfonilo.

5 En algunas realizaciones, una o varias de las soluciones comprenden además un agente reductor de biocarga. En algunas realizaciones, el agente reductor de biocarga comprende penicilina, estreptomycin, ácido peracético, etanol o una combinación de los mismos.

10 En algunas realizaciones, la solución hipotónica comprende uno o varios tampones orgánicos o inorgánicos, uno o varios antibióticos o antimicóticos, un pH alcalino, y en donde la osmolaridad de la solución se mantiene como hipotónica con respecto a las células.

15 En algunas realizaciones, la primera solución de tensioactivo comprende una sal seleccionada del grupo que consiste en KCl y NaCl, uno o varios tampones orgánicos o inorgánicos, uno o varios antibióticos o antimicóticos, un pH alcalino, uno o varios inhibidores de proteasas y del 0,2 al 3% (v/v) de un detergente aniónico, no iónico, zwitteriónico o catiónico seleccionado del grupo que consiste en Triton X-100, Triton X-200, Tween 20, Tween 80, desoxicolato de sodio, CHAPS, dodecilsulfato de sodio (SDS), sarcosinato de *N*-lauroilo, Igepal CA630 y sulfobetaína 10 y 16). En algunas realizaciones, la primera solución de tensioactivo es una solución salina a >1 M. En algunas realizaciones, la primera solución de tensioactivo comprende un tensioactivo aniónico. En algunas realizaciones, el tensioactivo aniónico es Triton X-100®.

20 En algunas realizaciones, la solución de enzimas de tipo nucleasa comprende una endonucleasa seleccionada del grupo que consiste en ADNasa, ARNasa y benzonasa, en donde la solución se prepara con un tampón fisiológico seleccionado del grupo que consiste en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS), HEPES, solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina tamponada con Tris (TBS), y en donde la solución se mantiene a un pH de 6 a 8. En algunas realizaciones, la enzima de tipo nucleasa es ADNasa, ARNasa o una combinación de las mismas.

25 En algunas realizaciones, la solución de limpieza comprende del 0,2 al 3% (v/v) de un detergente aniónico, no iónico, zwitteriónico o catiónico seleccionado del grupo que consiste en Triton X-100, Triton X-200, Tween 20, Tween 80, desoxicolato de sodio, CHAPS, dodecilsulfato de sodio (SDS), sarcosinato de *N*-lauroilo, Igepal CA630 y sulfobetaína 10 y 16, o fosfato de tri-*n*-butilo (TnBP), uno o varios tampones orgánicos o inorgánicos, uno o varios antibióticos o antimicóticos, un pH alcalino, y en donde la solución se prepara en un disolvente acuoso o bien en etanol al 70%. En algunas realizaciones, la solución de limpieza comprende además una base de TRIZMA®. En algunas realizaciones, la solución de limpieza comprende además etanol a aproximadamente el 70%. En algunas realizaciones, la solución de limpieza comprende además fosfato de tri-*n*-butilo (TnBP).

30 En algunas realizaciones, el método comprende además la realización de una o varias etapas a una temperatura de entre aproximadamente 22 °C y 40 °C. En algunas realizaciones, la puesta en contacto del tejido tratado con enzimas con la solución de limpieza se lleva a cabo a aproximadamente 22 °C.

35 En algunas realizaciones, el tejido de humano es un tejido cutáneo de humano. En algunas realizaciones, el tejido de humano son las partes blandas de humano. En algunas realizaciones, las partes blandas de humano son válvula cardíaca, tendón, ligamento, arteria, vena, diafragma, pericardio, aponeurosis, duramadre, tímpano, conducto aórtico o cartilago. En algunas realizaciones, el tejido de humano es una piel alógena de humano.

40 En algunas realizaciones, el tejido descelularizado está sustancialmente descelularizado. En algunas realizaciones, el tejido descelularizado está descelularizado al menos al 90%. En algunas realizaciones, el tejido descelularizado está descelularizado al menos al 95%. En algunas realizaciones, el tejido descelularizado se caracteriza por una ausencia sustancial de tinción positiva para los núcleos celulares. En algunas realizaciones, el tejido descelularizado se caracteriza por una ausencia sustancial de ADN celular. En algunas realizaciones, el tejido descelularizado se caracteriza por una ausencia sustancial de una o varias proteínas inmunógenas. En algunas realizaciones, la proteína inmunógena es HLA-DR o HLA-A,B,C.

45 En algunas realizaciones, el tejido bioprotésico se caracteriza por una ausencia sustancial de patógenos y esporas. En algunas realizaciones, el tejido descelularizado se caracteriza por una reducción de más del 70-80% de la cantidad de proteínas del citoesqueleto. En algunas realizaciones, las proteínas del citoesqueleto son vimentina, actina β, actina α, miosina, tubulina y vinculina. En algunas realizaciones, el tejido bioprotésico incluye la dermis.

50 En la presente memoria también se describe un tejido bioprotésico producido con el uso de uno o varios métodos descritos en la presente memoria.

55 En la presente memoria también se describe un tejido, en donde el tejido está libre de ácidos nucleicos. En la presente memoria también se describe un tejido, en donde el tejido está libre de una o varias moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). En la presente memoria también se describe un tejido, en donde el tejido está libre de bacterias estafilocócicas. En la presente memoria también se describe un tejido, en donde el tejido está libre de las bacterias estreptocócicas. En la presente memoria también se describe un tejido, en donde el tejido está libre de

bacterias enterocócicas. En la presente memoria también se describe un tejido, en donde el tejido está libre de bacterias de tipo bacilo. En la presente memoria también se describe un tejido, en donde la estructura del colágeno en el tejido no se ve alterada después del tratamiento con un método descrito en la presente memoria en comparación con un tejido de control en fresco.

5 En algunas realizaciones, un tejido descrito en la presente memoria está libre de bacterias de tipo *Staphylococcus aureus*. En algunas realizaciones, un tejido descrito en la presente memoria está libre de bacterias de tipo *Streptococcus pyogenes*. En algunas realizaciones, un tejido descrito en la presente memoria está libre de bacterias de tipo *Enterococcus*. En algunas realizaciones, un tejido descrito en la presente memoria está libre de *Bacillus subtilis*. En algunas realizaciones, un tejido está libre de hongos.

10 En algunas realizaciones, un tejido descrito en la presente memoria es piel de humano.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico es ADN o ARN. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es ARN. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es ADN. En algunas realizaciones, un tejido descrito en la presente memoria tiene menos de 0,5 ng de ADN por miligramo de peso seco del tejido. En algunas realizaciones, un tejido descrito en la presente memoria tiene menos de 0,5 ng de ADN por miligramo de peso seco del tejido según se mide mediante un ensayo de ADN con PicoGreen®.

15 En algunas realizaciones, el CMH es el HLA-DR. En algunas realizaciones, un tejido está libre de HLA-DR según se mide por inmunohistoquímica. En algunas realizaciones, el CMH es el HLA-A,B,C. En algunas realizaciones, un tejido está libre de HLA-A,B,C según se mide por inmunohistoquímica.

20 En algunas realizaciones, un tejido está libre de vimentina según se mide por inmunohistoquímica. En algunas realizaciones, un tejido está libre de actina β según se mide por inmunohistoquímica.

En algunas realizaciones, un tejido comprende elastina según se mide por histología con el uso de la tinción de Van Gieson. En algunas realizaciones, un tejido comprende uno o varios proteoglicanos según se mide por histología con el uso de la tinción tricrómica de Masson.

25 En algunas realizaciones, la estructura de colágeno de un tejido bioprotésico no se ve alterada sustancialmente en comparación con un tejido de control en fresco, según se valora por la termoestabilidad del colágeno. En algunas realizaciones, la temperatura de desnaturalización de un tejido bioprotésico no está sustancialmente alterada en comparación con un tejido de control en fresco. En algunas realizaciones, la temperatura de desnaturalización de un tejido bioprotésico es de aproximadamente 64 a 68 °C según se mide con una prueba de tensión hidrotérmica isométrica (THI).

30 En la presente memoria también se describe un kit de acuerdo con la reivindicación 36. En algunas realizaciones, el kit comprende una solución hipotónica. En algunas realizaciones, el kit incluye instrucciones para el uso del kit y su contenido. En algunas realizaciones, el kit incluye un recipiente estéril. En algunas realizaciones, el kit incluye un etiquetado con las instrucciones de uso. En algunas realizaciones, el tejido es un tejido sin tratar. En algunas realizaciones, el kit comprende además instrucciones para realizar un método descrito en la presente memoria.

35 **Breve descripción de las diferentes vistas de los dibujos**

Figura 1. Diagrama de flujo en el que se esbozan las etapas en una realización del proceso de descelularización para la piel de humano.

40 Figura 2. Histología de aloinjerto de piel humana en fresco (izquierda) y descelularizada (derecha). Obsérvese la conservación de la matriz de fibras de colágeno (rosa; los ejemplos están indicados con flechas blancas) y ausencia total de núcleos celulares (azul; los ejemplos están indicados con flechas negras) después de la descelularización. Tinción con hematoxilina y eosina, 200×.

Figura 3. Histología del aloinjerto de piel humana en fresco (izquierda) y descelularizada (derecha). Obsérvese la conservación de la matriz de fibras de colágeno (rosa; los ejemplos están indicados con flechas blancas) y elastina (negro; los ejemplos están indicados con flechas negras). Tinción de Verhoeff-Van Gieson, 400×.

45 Figura 4. Histología del aloinjerto de piel humana en fresco (izquierda) y descelularizada (derecha). Los cortes de tejido de la piel humana en fresco (a la izquierda) teñidos con la tinción tricrómica de Masson (tiñe los núcleos de las células (azul; los ejemplos están indicados con flechas grises), citoplasma celular (rojo/púrpura; los ejemplos están indicados con flechas negras) y colágeno, elastina y proteoglicanos de la matriz extracelular (verde; los ejemplos están indicados con flechas blancas)) revelan la presencia de numerosas células en la epidermis (parte inferior de la imagen por microscopía) y en la dermis (partes central y superior de la imagen por microscopía) con colágeno, elastina y proteoglicanos intactos. En cambio, después de la descelularización (a la derecha), solo permanece la tinción verde, lo que indica la presencia de colágeno, elastina y proteoglicanos en ausencia de materiales celulares. Tinción tricrómica de Masson, 200×.

Figura 5. Inmunohistoquímica de aloinjerto de piel humana en fresco (izquierda) y descelularizada (derecha) para detectar la proteína del citoesqueleto vimentina. Los cortes de tejido de la piel humana en fresco (a la izquierda) tratados con un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente la proteína citoesquelética vimentina, y que lleva peroxidasa como tinción, muestran la presencia de la vimentina en las células indicadas mediante coloraciones de color marrón oscuro (los ejemplos están indicados con flechas blancas). En cambio, después de la descelularización (a la derecha), se redujo sustancialmente la cantidad y la intensidad de la tinción de color marrón oscuro, lo que indica que la vimentina fue retirada de las proteínas del citoesqueleto de las células. Se observaron zonas grandes desprovistas de tinción dentro de la piel descelularizada y, allí donde la tinción era evidente, la intensidad y la frecuencia típicamente presentes se representan en el ejemplo que se muestra a la derecha. Anticuerpo antivimentínico, tinción con peroxidasa, 200×.

Figura 6. Inmunohistoquímica de aloinjerto de piel humana en fresco (izquierda) y descelularizada (derecha) para detectar la proteína del citoesqueleto actina β . Los cortes de tejido de la piel humana en fresco (a la izquierda) tratados con un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente la proteína citoesquelética actina β , y que lleva la peroxidasa como tinción, muestran la presencia de actina β en las células indicadas por la coloración de color marrón oscuro (los ejemplos están indicados con flechas blancas). En cambio, después de la descelularización (a la derecha), se redujo sustancialmente la cantidad y la intensidad de la tinción de color marrón oscuro, lo que indica que la actina β fue retirada de las proteínas del citoesqueleto de las células. Se observaron zonas grandes desprovistas de tinción dentro de la piel descelularizada y, allí donde la tinción era evidente, la intensidad y la frecuencia típicamente presentes se representan en el ejemplo que se muestra a la derecha. Anticuerpo antiactina β , tinción con peroxidasa, 100×.

Figura 7. Composición de imágenes de la piel humana en fresco (parte superior) y con descelularización acuosa (parte inferior) teñida para la proteína del citoesqueleto vimentina (dilución 1:80) identificada por la coloración gris oscura/negra. La composición de imágenes se creó a partir de cada una de las imágenes tomadas a 100× aumentos. La composición revela que la tinción es muy escasa y mínima después de la descelularización, lo que indica una retirada sustancial de la proteína citoesquelética vimentina.

Figura 8. Composición de imágenes de la piel humana en fresco (parte inferior) y con descelularización en etanol (parte superior) teñida para la proteína del citoesqueleto vimentina (dilución de 1:80) identificada por la coloración gris oscura/negra. La composición de imágenes se creó a partir de cada una de las imágenes tomadas a 100× aumentos. La composición revela que la tinción es muy escasa y mínima después de la descelularización, lo que indica una retirada sustancial de la proteína citoesquelética vimentina.

Figura 9. Composición de imágenes de la piel humana en fresco (parte superior) y con descelularización acuosa (parte inferior) teñida para la proteína del citoesqueleto actina β (dilución de 1:4000) identificada por la coloración gris oscura/negra. La composición de imágenes se creó a partir de cada una de las imágenes tomadas a 100× aumentos. La composición revela que la tinción es muy escasa y mínima después de la descelularización, lo que indica una retirada sustancial de la proteína citoesquelética actina β .

Figura 10. Composición de imágenes de la piel humana en fresco (parte inferior) y con descelularización con etanol (parte superior) teñida para la proteína del citoesqueleto actina β (dilución de 1:4000) identificada por la coloración gris oscura/negra. La composición de imágenes se creó a partir de cada una de las imágenes tomadas a 100× aumentos. La composición revela que la tinción es muy escasa y mínima después de la descelularización, lo que indica una retirada sustancial de la proteína citoesquelética actina β .

Figura 11. Inmunohistoquímica del aloinjerto de piel humana en fresco (izquierda) y descelularizada (derecha) para la detección del antígeno de los leucocitos de humano HLA-A,B,C. Los cortes de tejido de la piel humana en fresco (a la izquierda) tratados con un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente la proteína de la membrana celular HLA-A,B,C, y que lleva la peroxidasa como tinción, muestran la presencia del HLA-A,B,C sobre las células, según está indicado por la coloración de color marrón oscuro (los ejemplos están indicados con flechas blancas). En cambio, después de la descelularización (a la derecha), hay una ausencia de tinción marrón oscura, lo que indica que el HLA-A,B,C fue retirado de las proteínas de la membrana celular. Esto es un indicador directo de la capacidad que tiene el tratamiento para retirar los materiales de la membrana celular. Anticuerpo contra el HLA-A,B,C, tinción con peroxidasa, 400×.

Figura 12. Inmunohistoquímica del aloinjerto de piel humana en fresco (izquierda) y descelularizada (derecha) para la detección del antígeno de los leucocitos de humano HLA-DR. Los cortes de tejido de la piel humana en fresco (a la izquierda) tratados con un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente la proteína inmunógena de la membrana celular HLA-DR, y que lleva la peroxidasa como tinción, muestran la presencia del HLA-DR sobre las células, según está indicado por la coloración de color marrón oscuro (los ejemplos están indicados con flechas blancas). En cambio, después de la descelularización (a la derecha), hay una ausencia de tinción marrón oscura, lo que indica que el inmunógeno HLA-DR fue retirado de las proteínas de la membrana celular. Esto es un indicador directo de la capacidad que tiene el tratamiento para retirar los materiales de la membrana celular y una proteína importante asociada al rechazo del aloinjerto. Anticuerpo contra el HLA-DR, tinción con peroxidasa, 200×.

Figura 13. Composición de imágenes de la piel humana en fresco (abajo) y con descelularización acuosa (arriba) teñida con un anticuerpo monoclonal (dilución de 1:400) que reconoce específicamente la proteína de la membrana celular HLA-A,B,C, y que lleva la peroxidasa como tinción. La presencia del HLA-A,B,C sobre las células se indica mediante coloración gris oscura/negra. En cambio, después de la descelularización (en la parte superior), hay una ausencia de tinción, lo que indica que el HLA-A,B,C fue retirado de las proteínas de la membrana celular. La composición de imágenes se creó a partir de cada una de las imágenes tomadas a 100× aumentos.

Descripción detallada

La tecnología de descelularización es un método que tiene el potencial de revolucionar el trasplante de aloinjertos de tejidos. La descelularización implica la extracción de materiales celulares (el origen de la respuesta inmunitaria y de los virus) de los tejidos para aloinjerto, lo que deja un armazón de matriz extracelular nativo e intacto desde el punto de vista estructural que comprende colágeno, elastina y proteoglicanos. Además, el procedimiento de descelularización, tal como se describe en la presente memoria, da lugar a injertos más seguros y más estériles al eliminar las bacterias y los virus.

Se debe observar que el lenguaje utilizado en la presente memoria se ha seleccionado principalmente con el propósito de ser legible e instructivo, y no se puede haber seleccionado para delinear o circunscribir la materia objeto de la invención.

Tal y como se utiliza en esta especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular «un», «una», «la» y «el» incluyen referentes plurales a menos que el contexto claramente dictamine otra cosa. Así pues, por ejemplo, la referencia a «un tejido descelularizado» incluye una combinación de dos o más tejidos descelularizados, y similares.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, cualquier referencia a «un aspecto» significa que un elemento, rasgo, estructura o característica concretos que se describa en conexión con el aspecto está incluido en al menos un aspecto. Las apariciones de la frase «en un aspecto» en diferentes lugares de la especificación no hacen todas referencia necesariamente al mismo aspecto.

Los términos «comprende», «que comprende», «incluye», «que incluye», «tiene», «que tiene» o cualquier otra variación de los mismos se pretende que cubra una inclusión que no es exhaustiva. Por ejemplo, un procedimiento, método, artículo o aparato que comprende una lista de elementos no está limitado necesariamente a tan solo estos elementos, sino que puede incluir otros elementos que no se enumeran expresamente o que son inherentes a tal procedimiento, método, artículo o aparato. Además, a menos que se mencione expresamente lo contrario, «o» se refiere a una o inclusiva y no a una o exclusiva. Por ejemplo, una condición A o B se satisface mediante cualquiera de las siguientes condiciones: A es verdadero (o está presente) y B es falso (o no está presente), A es falso (o no está presente) y B es verdadero (o está presente), y tanto A como B son verdaderas (o están presentes).

«Aproximadamente», tal y como se utiliza en la presente memoria cuando se hace referencia a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal y similar, significa que abarca variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, más preferiblemente $\pm 5\%$, incluso más preferiblemente $\pm 1\%$ y aún más preferiblemente $\pm 0,1\%$ del valor especificado, ya que tales variaciones son adecuadas para realizar los métodos descritos.

El término «ácido nucleico» se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y a los polímeros de los mismos en una forma monocatenaria o bicatenaria, compuestos de monómeros (nucleótidos) que contienen un azúcar, fosfato y una base que es una purina o bien una pirimidina. El ácido desoxirribonucleico (ADN) en la mayoría de los organismos es el material genético, mientras que el ácido ribonucleico (ARN) interviene en la transferencia de la información contenida dentro del ADN y convertirla en proteínas. Los términos «ácido nucleico», «molécula de ácido nucleico», «fragmento de ácido nucleico», «secuencia o segmento de ácido nucleico» o «polinucleótido» también se pueden utilizar indistintamente con gen, ADNc, ADN y ARN codificado por un gen.

Los términos «polipéptido», «proteína» y «péptido» se utilizan indistintamente en la presente memoria. Se conoce bien en la técnica de la bioquímica de proteínas que los aminoácidos, las «piezas fundamentales» de las proteínas, tienen un tamaño y unas características concretas, tales como la carga, hidrofobia y hidrofilia. Por ejemplo, los aminoácidos apolares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y tirosina. Los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos con carga positiva (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos con carga negativa (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico.

En determinados aspectos, la presente descripción da a conocer el tejido que está sustancialmente libre de algún componente (p. ej., una o varias proteínas del citoesqueleto, moléculas del CMH o patógenos tales como bacterias y virus). Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «sustancialmente libre» significa que la presencia de un componente en concreto no se detecta mediante los ensayos conocidos o bien, si se detecta, solo está presente en una cantidad que está de acuerdo con la normativa sobre tejidos de la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA, por su nombre en inglés) según se presenta en el Título 21 del Código de Reglamentos Federales (CRF), partes 1270 y 1271. En diferentes aspectos, «sustancialmente libre» puede incluir un tejido que está libre de un componente a aproximadamente el 90%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%. En

determinados aspectos, «sustancialmente libre» significa que el tejido está completamente libre del componente. En determinados aspectos, «sustancialmente libre» significa que el tejido está libre del componente al 100%.

5 Tal y como se utiliza en la presente memoria, un tejido que está «sustancialmente libre de un patógeno» o «sustancialmente libre de patógenos» y la terminología similar acerca de un patógeno específico o una clase de patógenos significa que un tejido cumple los estándares de la Asociación Estadounidense de Bancos de Tejidos (AATB, por su nombre en inglés) para depositar tejidos bajo el K2.200.

El término «descelularización» se refiere a la retirada y/o extracción de células y/o componentes celulares de un tejido.

10 En determinados aspectos, la presente descripción garantiza que un tejido está sustancialmente descelularizado. Tal y como se utiliza en la presente memoria, «sustancialmente descelularizado» significa que el tejido está libre de células al 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%. En determinados aspectos, «sustancialmente descelularizado» significa que el tejido está completamente libre de células. En determinados aspectos, «sustancialmente descelularizado» significa que el tejido está libre de células al 100%.

El término «tejido bioprotésico para humano» se refiere a un tejido de humano que ha sido sustancialmente descelularizado. En algunas realizaciones, el tejido bioprotésico para humano también ha sido esterilizado.

15 La frase «componente celular», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a las sustancias que constituyen una porción de una célula, lo que incluye membranas celulares y macromoléculas que se suelen encontrar encerradas dentro de una membrana celular, embebidas dentro de una membrana celular o adjuntas a una membrana celular.

20 Cualquier término no definido directamente en la presente memoria se debe interpretar que tiene los significados que suelen estar asociados a ellos, tal y como se conoce dentro de la técnica de la presente descripción. Determinados términos se explican en la presente memoria para dar a conocer una guía adicional a quien la ponga en práctica al describir las composiciones, dispositivos, métodos, y similares, de aspectos de las presente descripción, y cómo fabricarlos o utilizarlos. Se apreciará que la misma cosa se puede decir de más de una manera. Por consiguiente, se pueden utilizar un lenguaje alternativo y sinónimos para cualquiera o varios de los términos explicados en la presente memoria. No se da ninguna importancia a si un término está, o no está, elaborado o explicado en la presente memoria.

25 Se dan a conocer algunos métodos, materiales y similares que son sinónimos o sustituibles. La enumeración de uno o unos pocos sinónimos o equivalentes no excluye el uso de otros sinónimos o equivalentes, a menos que se mencione de manera explícita. El uso de ejemplos, entre ellos los ejemplos de términos, solo tiene propósitos ilustrativos y no limita el alcance ni el significado de los aspectos de la presente descripción en la presente memoria.

Métodos

30 En algunos aspectos, los métodos de descelularización de la presente descripción implican una serie de etapas de lavado cada vez más estériles que incluyen variaciones entre las condiciones hiposmóticas e hiperosmóticas, tensioactivo, enzima y soluciones tamponantes fisiológicas. En la figura 1 se da a conocer un diagrama de flujo general que es representativo de los métodos de una realización de la presente descripción. Cada etapa del procedimiento está designada para degradar y retirar de manera secuencial los componentes celulares al mismo tiempo que se

35 impide la degradación o la destrucción de los componentes de la matriz extracelular.

40 De acuerdo con determinados aspectos de la presente descripción, las condiciones hiposmóticas se aplican primero para hacer estallar las células. Cuando la muestra comprende piel, estas condiciones también sirven para retirar con suavidad la capa celular de la epidermis al mismo tiempo que se deja intacta la matriz de la membrana basal subyacente. En determinados aspectos, se aplica una segunda solución, en donde la solución comprende un contenido elevado de sales y tensioactivo (p. ej., Triton-X100®). Esta segunda solución se utiliza para solubilizar y retirar los componentes del citoplasma y del citoesqueleto. En otros aspectos, el material genético de las células se degrada entonces con el uso de endonucleasas (p. ej., ADNasa, ARNasa) que pueden también atacar a las bacterias y a los virus. En otros aspectos, los tejidos se pueden tratar posteriormente con una solución que comprende un caótrofo y/o un tensioactivo para retirar adicionalmente cualquier remanente de material celular destruido. En

45 determinados aspectos, esa solución comprende un fosfato de tri-n-butilo (TnBP), un caótrofo que destruye los puentes de hidrógeno y las interacciones hidrófobas. El TnBP también se sabe que mejora la esterilidad al desactivar y retirar las proteínas víricas de los productos sanguíneos (Horowitz et al., *Blood*, 79 (3): 852-831 (1992)). Determinados aspectos de la presente descripción implican la etapa adicional de lavar el tejido lo suficiente hasta dejar una cantidad residual de tensioactivo por debajo de los niveles de toxicidad para la célula (Gratzer et al., *Tissue Engineering*, 12 (10): 2975-2983 (2006)).

50

Aunque se afirma que determinados métodos proporcionan la descelularización del tejido, la presente descripción describe uno de los primeros métodos conocidos que realmente dan lugar a la descelularización sustancialmente completa. La mayoría de los procedimientos de descelularización se pueden clasificar entre un procedimiento de base física, un procedimiento de base química o un procedimiento de base bioquímica. Hay muchos protocolos que toman

55 prestado algo de estas clasificaciones de los procedimientos y la interpretación de los efectos de la descelularización sobre la matriz extracelular se hace más difícil a medida que se incrementa la complejidad de los protocolos.

La presente descripción se refiere en algunos aspectos a un método para hacer que un tejido se vuelva acelular. En diferentes aspectos de la presente descripción, la descelularización se puede alcanzar mediante una serie de tratamientos químicos, entre ellos la incubación con determinadas sales, detergentes o enzimas. El método comprende la exposición del tejido a una solución hipotónica en las condiciones en las que se produce la lisis celular, y el tratamiento con nucleasas del tejido resultante para retirar los ácidos nucleicos y los grupos asociados que contienen fósforo. El tratamiento con nucleasas detiene con eficacia la replicación celular y la síntesis de proteínas.

En algunos aspectos, en la presente memoria se describe un método para producir un tejido bioprotésico para humano. En algunos aspectos, el método incluye poner en contacto un tejido de humano con una solución hipotónica para producir un tejido lisado. En algunos aspectos, el método incluye poner en contacto el tejido lisado con una primera solución de tensioactivo para producir un tejido tratado con tensioactivo. En algunos aspectos, el método incluye poner en contacto el tejido tratado con tensioactivo con una solución de enzimas de tipo nucleasa para producir un tejido tratado con enzimas. En algunos aspectos, el método incluye poner en contacto el tejido tratado con enzimas con una solución de limpieza que comprende un segundo tensioactivo, un caótrofo, o una mezcla de los mismos, para producir un tejido descelularizado. En algunos aspectos, el método incluye poner en contacto el tejido descelularizado con una solución de agente reductor de biocarga para producir el tejido bioprotésico para humano.

En algunos aspectos, el método incluye poner en contacto un tejido de humano con una solución hipotónica para producir un tejido lisado. Tal y como se utiliza en la presente memoria, «solución hipotónica» se refiere a una solución acuosa con una concentración de sales menor que la encontrada en las células normales del organismo (p. ej., <300 mOsm). Una solución hipotónica está diseñada por lo general para (i) provocar que las células del tejido absorban agua (condiciones hipotónicas) y que se acaben estallando, y (ii) provocar que la capa epidérmica intacta de un tejido se separe de la dermis subyacente al mismo tiempo que se deja intacta la membrana basal. Así pues, una solución hipotónica puede ser cualquier solución acuosa con una concentración de sales menor que la encontrada en las células normales (a saber, <300 mOsm) que provoca hinchazón de las células. Una solución hipotónica puede incluir uno o varios tampones orgánicos o inorgánicos, un pH alcalino, uno o varios antibióticos/antimicóticos, uno o varios inhibidores de proteasas y el mantenimiento de una osmolaridad que es hipotónica para las células. En algunos aspectos, el pH alcalino ayuda a limitar la actividad de las proteasas, cuando se desee.

En algunos aspectos el método incluye poner en contacto un tejido de humano con una primera solución de tensioactivo para producir un tejido tratado con tensioactivo. Tal y como se utiliza en la presente memoria, «primera solución de tensioactivo» se refiere a una solución que incluye un detergente aniónico, no iónico, zwitteriónico y/o catiónico. Un detergente aniónico, no iónico, zwitteriónico y/o catiónico puede incluir Triton X-100, Triton X-200, Tween 20, Tween 80, desoxicolato de sodio, CHAPS, dodecilsulfato de sodio (SDS), sarcosinato de *N*-lauroilo, Igepal CA630 y/o sulfobetaina 10 y 16. En algunos aspectos, la primera solución de tensioactivo puede ser una solución tamponada de salinidad elevada (p. ej., >1 M) a pH alcalino (p. ej., pH = 8-10) que contiene del 0,2 al 3% (v/v) del detergente aniónico, no iónico, zwitteriónico o catiónico. En algunos aspectos la primera solución de tensioactivo puede incluir sal (p. ej., KCl, NaCl), uno o varios tampones orgánicos o inorgánicos, uno o varios antibióticos/antimicóticos, uno o varios detergentes aniónicos, no iónicos, zwitteriónicos o catiónicos, y uno o varios inhibidores de proteasas. La primera solución de tensioactivo está diseñada en términos generales para retirar las membranas celulares y los componentes del citoesqueleto. El pH alcalino ayuda a limitar la actividad de las proteasas, cuando se desee.

Se ha demostrado que el uso del detergente Triton X-100® retira las membranas celulares, tal y como está detallado en la patente de los EE. UU. n.º 4 801 299. Otros detergentes aceptables para la descelularización incluyen monooleato de sorbitano y polioxietileno (20) y monooleato de sorbitano y polioxietileno (80) (TWEEN 20® y 80), desoxicolato de sodio, sulfonato de 3-[(3-cloramidopropil)-dimetilamino]-1-propano, octilglucósido y dodecilsulfato de sodio. En algunos aspectos, un detergente puede incluir un condensado de óxido de etileno y octilfenol.

En algunos aspectos, el método incluye poner en contacto un tejido de humano con una solución de enzimas de tipo nucleasa para producir un tejido tratado con enzimas. Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «enzima» se refiere a un biocatalizador basado en proteínas. Una enzima puede utilizarse por lo general para degradar los ácidos nucleicos y ribonucleicos. Las enzimas pueden incluir nucleasas, tales como endonucleasas (p. ej., ADNasa, ARNasa, benzonasa). En algunos aspectos, la desoxirribonucleasa I es de páncreas bovino (*Bos taurus*) (NM_174534.2; NP_776959.1). En algunos aspectos, la ribonucleasa A es de páncreas bovino (*Bos taurus*) (NM_181810.1; NP_861526.1).

En algunos aspectos, las enzimas se pueden utilizar para llevar a cabo la descelularización, entre las que se incluyen, pero sin limitarse a ellas, dispasa II, tripsina y termolisina. Estas enzimas reaccionan con diferentes componentes del colágeno y de las conexiones intercelulares para conseguir sus efectos. La dispasa II ataca al colágeno de tipo IV, que es un componente de la lámina densa y ancla las fibrillas de la membrana basal. La termolisina ataca al antígeno del pénfigo vesicular en el hemidesmosoma de la capa basal de los queratinocitos. La tripsina ataca al complejo del desmosoma entre las células. Debido a la naturaleza proteolítica de estas enzimas, se debe prestar atención para que la retirada de las células se produzca sin un daño significativo a la matriz extracelular, incluido el complejo de la membrana basal. Esto está en función de la concentración, del tiempo y de la temperatura. Si se utiliza durante un tiempo demasiado prolongado o a una concentración demasiado alta, la dispasa II, por ejemplo, puede retirar el complejo de la membrana basal por completo de la dermis.

En algunos aspectos, el método incluye poner en contacto un tejido de humano con una solución de limpieza que comprende un segundo tensioactivo, un caótropro, o una mezcla de los mismos, para producir un tejido descelularizado. Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «solución de limpieza» significa que una solución incluye un detergente aniónico, no iónico, zwitteriónico y/o catiónico, o un caótropro. Un detergente aniónico, no iónico, zwitteriónico y/o catiónico puede incluir Triton X-100, Triton X-200, Tween 80, desoxicolato de sodio, CHAPS, dodecilsulfato de sodio (SDS), sarcosinato de *N*-lauroilo, Igepal CA630 y/o sulfobetaina 10 y 16. Tal y como se utiliza en la presente memoria, un «caótropro» significa que una sustancia incrementa la transferencia de los grupos apolares al agua debido a su capacidad para disminuir la estructura «ordenada» del agua y para incrementar su lipofilia. Por lo general, un caótropro provoca la disolución de membranas biológicas, la solubilización de proteínas en partículas, cambios de la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas, y la desnaturalización de los ácidos nucleicos. Un caótropro puede incluir fosfato de tri-*n*-butilo (TnBP), iones (p. ej., SCN⁻, CNS⁻, ClO₄⁻, I⁻, Br⁻, CH₃-COO⁻), derivados de urea, derivados de guanidina. En algunos aspectos, una solución de limpieza puede incluir uno o varios tampones orgánicos o inorgánicos, uno o varios antibióticos/antimicóticos, un pH alcalino, y la solución está preparada en un disolvente de agua estéril o de etanol al 70%. En algunos aspectos, una solución de limpieza puede incluir del 0,2 al 3% (v/v) de un detergente aniónico, no iónico, zwitteriónico o catiónico, o un caótropro, uno o varios tampones orgánicos o inorgánicos, uno o varios antibióticos/antimicóticos, un pH alcalino, y la solución está preparada en un disolvente (i) acuoso o bien (ii) con etanol al 70%. La solución de limpieza suele estar diseñada para retirar cualquier componente celular remanente (p. ej., proteínas del citoesqueleto, ADN, fragmentos de ARN). Al igual que más arriba, el pH alcalino ayuda a limitar la actividad de las proteasas, cuando se desee.

En algunos aspectos el método incluye poner en contacto un tejido de humano con una solución isotónica. Tal y como se utiliza en la presente memoria, «solución isotónica» significa que una solución acuosa tiene una concentración de sales aproximadamente igual o igual a la hallada en las células normales del organismo. En algunos aspectos, las soluciones isotónicas pueden incluir la solución de Ringer lactada, la solución salina normal (0,9%) y la solución salina tamponada con fosfato (PBS).

En algunos aspectos el método incluye poner en contacto un tejido de humano con un inhibidor de proteasas. Tal y como se utiliza en la presente memoria, «inhibidor de proteasas» significa que un agente es capaz de desactivar las enzimas que son capaces de degradar las proteínas. Los inhibidores de proteasas pueden incluir fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF), aprotinina, leupeptina y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

En diferentes aspectos, los inhibidores de proteasas se emplean en combinación con otros reactivos para impedir la degradación de la matriz extracelular. Los tejidos conjuntivos que contienen colágeno contienen proteasas y colagenasas a modo de enzimas endógenas en la matriz proteica extracelular. Además, determinados tipos de células, entre ellas las células del músculo liso, los fibroblastos y las células endoteliales, contienen muchas de estas enzimas dentro de vesículas denominadas lisosomas. Cuando estas células se ven dañadas por acontecimientos tales como la hipoxia, los lisosomas se rompen y se libera su contenido. Como resultado, la matriz extracelular puede sufrir a un daño intenso debido a la degradación de proteínas, proteoglucano y colágeno. Este daño puede ser intenso, como se demuestra en los casos clínicos de isquemia cardíaca en donde una reducción de oxígeno que es insuficiente para provocar la muerte celular da lugar a un daño pronunciado de la matriz de colágeno. Además, una consecuencia de la degradación extracelular es la liberación de quimiotácticos, que atraen al injerto las células inflamatorias, entre ellas los leucocitos polimorfonucleares y los macrófagos, con la intención de retirar el tejido muerto o dañado. Sin embargo, estas células también perpetúan la destrucción de la matriz extracelular a través de una respuesta inflamatoria inespecífica. Por consiguiente, la solución del procedimiento contiene uno o varios inhibidores de proteasas seleccionados del grupo de *N*-etilmaleimida (NEM), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido etilenglicol-bis-(2-aminoetil(eter)-*N,N,N',N'*-tetraacético, cloruro de amonio, pH elevado, aprotinina y leupeptina para prevenir tal daño.

El método incluye poner en contacto un tejido de humano con una solución de agente reductor de biocarga. Tal y como se utiliza en la presente memoria, «agente reductor de biocarga» hace referencia a un agente que puede inactivar, destruir o eliminar materiales infecciosos (p. ej., bacterias, esporas, hongos, moho o virus). Los agentes reductores de biocarga pueden incluir un antibacteriano, un alcohol (p. ej., metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, *t*-butilo), un antivírico, un antimicótico, dióxido de cloro, un detergente, antimicrobianos, antifúngicos, peróxido de hidrógeno, hidróxido de sodio y/o ácido peracético. Véase también la patente de los EE. UU. n.º 5 460 962.

Las soluciones de la presente descripción pueden optativamente comprender un tampón adecuado. El tampón puede llevar uno de los muchos tampones orgánicos diferentes. En determinados aspectos, un tampón orgánico se selecciona del grupo que consiste en ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico (MES), tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) y (*N*-[2-hidroxietil]piperazina-*N'*-[ácido 2-etanosulfónico]) (HEPES). Como alternativa, un tampón con poca sal o fisiológico que incluye fosfato, bicarbonato, acetato, citrato, glutamato con o sin glicina puede ser más adecuado en determinadas aplicaciones.

En algunos aspectos, una o varias de las soluciones utilizadas en los métodos descritos en la presente descripción comprenden además al menos un inhibidor de proteasas. En determinados aspectos, el inhibidor de proteasas es un inhibidor de serina proteasas, inhibidor de metaloproteasas o una combinación de los mismos. En algunos aspectos, una o varias de las soluciones utilizadas en los métodos descritos en la presente descripción comprenden al menos

una enzima. En determinados aspectos, la enzima es ADNasa, ARNasa o una combinación de las mismas. En algunos aspectos, una o varias de las soluciones utilizadas en los métodos descritos en la presente descripción comprenden un tensioactivo. En determinados aspectos, el tensioactivo es un tensioactivo aniónico. En otros aspectos, el tensioactivo aniónico es Triton X-100®. En algunos aspectos, una o varias de las soluciones utilizadas en los métodos descritos en la presente descripción comprenden además la base de TRIZMA®. En otros aspectos, la presente descripción da a conocer métodos para producir un tejido bioprotésico, en donde el método comprende además tratar el tejido con ultrasonidos. En algunos aspectos, una o varias de las soluciones utilizadas en los métodos descritos en la presente descripción comprenden además fosfato de tri-n-butilo (TnBP). En algunos aspectos, una o varias de las soluciones utilizadas en los métodos descritos en la presente descripción comprenden además etanol a aproximadamente el 70%.

En determinados aspectos, para la descelularización del tejido se puede utilizar una combinación de tratamientos físicos y tratamientos químicos o bioquímicos.

En determinados aspectos, las células se lisan físicamente mediante el uso de gradientes osmóticos, compresión/masaje mecánicos o ciclos de congelación y descongelación. Los tratamientos hipertónicos e hipotónicos ejercen la presión hidrostática sobre las membranas celulares en un medio acuoso, lo que las hace estallar y que liberen el contenido de la célula. El contenido de la célula es entonces más accesible a los tratamientos posteriores con detergentes o a los procedimientos de lavado isotónico. La compresión mecánica o el masaje se puede utilizar para propiciar la degradación de la membrana y la exposición gradual de más membranas celulares a las soluciones de extracción. Los ciclos de congelación y descongelación se pueden utilizar para matar las células y a continuación fracturarles la membrana celular de tal modo que los posteriores procedimientos de lavado puedan acceder al contenido del interior celular y a las membranas fragmentadas.

En otros aspectos, el método incluye la realización de una o varias etapas a una temperatura de entre 20 °C y 40 °C. En otros aspectos, una o varias etapas del método se llevan a cabo a aproximadamente 30 °C. En otros aspectos, una o varias etapas del método se realizan a temperatura ambiente. En otros aspectos, una o varias etapas del método se realizan a 37 °C. En otros aspectos, una o varias etapas del método se realizan a 22 °C. En otros aspectos, una o varias etapas del método se realizan a menos de 20, aproximadamente a 20, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, aproximadamente 40, o más de 40 °C.

En algunos aspectos, los tejidos se recogen y preparan para el tratamiento. La extensión de la preparación del tejido va a depender del tejido a tratar, pero lo normal es que implique la retirada de elementos ajenos al tejido y el corte del tejido a un tamaño que facilite la descelularización.

En algunos aspectos, un tejido se sumerge en una solución salina hipotónica (<300 mOsm) con un pH = 7-9 (p. ej., aproximadamente 7, 7, aproximadamente 8, 8, 9, o aproximadamente 9) con agentes antiproteolíticos cuya concentración depende del inhibidor utilizado (p. ej., fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF), aprotinina, leupeptina, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)), antimicrobianos (p. ej., penicilina, vancomicina, estreptomina, gentamicina, kanamicina, neomicina, azida de sodio (NaN₃)) con o sin antifúngicos (p. ej., amfotericina B, nistatina), preparada con agua desionizada de calidad para cultivo celular de tipo II. El tejido se puede tratar con una relación mínima de volumen de solución por tejido de 20:1, 30:1, 40:1 o 50:1 (p. ej., 20:1 a 50:1), en una bandeja de agitación por rotación a 40-65 rpm, durante 24 a 48 horas, T = 4-40 °C, en la que los cambios de la solución se producen a intervalos de 12 horas.

En determinados aspectos, el tejido se transfiere a continuación a una solución tamponada de gran salinidad (>1 M, NaCl, KCl) (pH = 8-10) que contiene del 0,2 al 3% (v/v) del detergente aniónico, no iónico, zwitteriónico o catiónico (p. ej., Triton X-100®, Triton X-200®, Tween 20®, Tween 80®, desoxicolato de sodio, CHAPS, dodecilsulfato de sodio (SDS), sarcosinato de *N*-lauroilo, Igepal CA630, sulfobetaina 10 y 16) e inhibidores de proteasas (p. ej., fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF), aprotinina, leupeptina, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)) preparado con agua desionizada de calidad para cultivo celular de tipo II. El tejido se trata con una relación de volumen de solución por tejido de 20:1, 30:1, 40:1 o 50:1 (p. ej., 20:1 a 50:1) en una bandeja de agitación por rotación a 40-65 rpm durante 24-48 horas, T = 4-40 °C, en donde los cambios de la solución se producen a intervalos de 12 horas.

En otros aspectos, el tejido se puede someter después a enjuagues con tampón fisiológico estéril (p. ej., solución salina equilibrada de Hanks (HBSS), HEPES, solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina tamponada con Tris (TBS)), pH = 6-8, T = 4-40 °C, 5 minutos a 1 hora, y a continuación se trata con una solución de endonucleasas (p. ej., ADNasa, ARNasa, benzonasa) preparada en un tampón fisiológico (p. ej., solución salina equilibrada de Hanks (HBSS), HEPES, solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina tamponada con Tris (TBS)), pH = 6-8, durante 1 a 5 horas, T = 20-40 °C. Después, el tejido se enjuaga en el tampón fisiológico estéril solo, tal y como se especificó más arriba, durante 5 minutos a 1 hora, T = 4-40 °C.

En otros aspectos, el tejido se trata con una solución estéril de detergente aniónico, no iónico, zwitteriónico o catiónico del 0,2 al 3% (v/v) (p. ej., Triton X-100®, Triton X-200®, Tween 20®, Tween 80®, desoxicolato de sodio, CHAPS, dodecilsulfato de sodio (SDS), sarcosinato de *N*-lauroilo, Igepal CA630, sulfobetaina 10 y 16) o caótropro (p. ej., fosfato de tri-n-butilo (TnBP)) preparado en (i) solución tamponada fisiológica (solución salina equilibrada de Hanks (HBSS), HEPES, solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina tamponada con Tris (TBS)) ajustada a pH = 7-

9 con antimicrobianos (p. ej., penicilina, vancomicina, estreptomina, gentamicina, kanamicina, neomicina, azida de sodio (NaN_3)) con o sin antifúngicos (amfotericina B, nistatina), o bien con (ii) etanol al 50-70%, durante 24 a 48 horas a una $T = 4-40^\circ\text{C}$. Después, el tejido se enjuaga con una solución estéril tamponada con Tris a 50 mM ajustada a pH 9 (que no contiene detergente ni caótopo) durante 12 a 24 horas a $T = 4-40^\circ\text{C}$.

5 En otros aspectos, el tejido se trata con la solución de ácido peracético (PAA) al 0,05-3% (v/v) en etanol o con solución salina tamponada con fosfato (PBS) neutralizada a un pH = 7 a 7,5, durante unos 30 minutos a 4 horas a $T = 20-40^\circ\text{C}$. Después, el tejido se puede enjuagar con tampón fisiológico estéril (p. ej., solución salina equilibrada de Hanks (HBSS), HEPES, solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina tamponada con Tris (TBS)) con antimicrobianos (p. ej., penicilina, vancomicina, estreptomina, gentamicina, kanamicina, neomicina, azida de sodio (NaN_3)) con o sin antifúngicos (p. ej., amfotericina B, nistatina) durante 12 a 24 horas a $T = 4-40^\circ\text{C}$.

10 En otros aspectos, los tejidos se pueden embotellar en condiciones estériles en (i) tampón fisiológico estéril (p. ej., solución salina equilibrada de Hanks (HBSS), HEPES, solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina tamponada con Tris (TBS)) con antimicrobianos (p. ej., penicilina, vancomicina, estreptomina, gentamicina, kanamicina, neomicina, azida de sodio (NaN_3)) con o sin antifúngicos (p. ej., amfotericina B, nistatina), o bien (ii) etanol al 50-70%, y se conservó a $T = 4-25^\circ\text{C}$.

15 En algunos aspectos, se consigue piel de humano y se prepara para el tratamiento. La extensión de la preparación del tejido depende de la calidad de la piel obtenida, pero normalmente implica la retirada de los elementos ajenos al tejido y el corte del tejido al tamaño o tamaños requeridos por los usuarios finales. Para este ejemplo, tres muestras de piel de humano se tratan en un recipiente. El tamaño de las muestras utilizadas es de 4 cm \times 5 cm y los tejidos se tratan con una relación de volumen de solución por tejido de 50:1.

20 En algunos aspectos, los especímenes se transfieren a un frasco de polipropileno provisto de una tapa que contiene un volumen preferido de 300 ml de un tampón de Tris hipotónico (<300 mmol/l a un valor preferido de 10 mM) y un inhibidor de metaloproteasas a una concentración de 1 μM a 25 mM (valor preferido de 5 mM) y el inhibidor que se utiliza es el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Esta solución se ajusta a pH = 7-9 (preferido a pH = 8) con HCl/NaOH antes de su uso. A este recipiente se le añaden antibióticos/antimicóticos a 50-100 U/ml o 50-100 $\mu\text{g/ml}$ en función del agente (se prefiere el uso de 5 ml/l de una solución a 100 \times de penicilina/estreptomina con una concentración madre de 10 00 U/ml / 10 000 mg/ml) y un inhibidor de proteasas (valor preferido de 0,35 ml/l del inhibidor de serina proteasas (fluoruro de fenilmetanosulfonilo al 5% en etanol al 100%)). El recipiente se deja mezclar con suavidad en una bandeja de agitación a 40-65 rpm, $T = 20-25^\circ\text{C}$, durante 24 horas con cambio con una solución recién preparada a las 12 horas. Esta etapa está diseñada para (i) provocar que las células del tejido absorban agua (condiciones hipotónicas) y acaben por estallar, y (ii) provocar que la capa de epidermis intacta se separe de la dermis subyacente al mismo tiempo que deja intacta la membrana basal.

25 En algunos aspectos, se decanta la solución hipotónica anterior y se reemplaza por una relación mínima de volumen de solución por tejido de 50:1 (preferido 300 ml) de una solución de gran salinidad (valor preferido de 1,5 M de cloruro de potasio con el tampón de Tris a 50 mM) que contiene Triton X-100 al 1% (v/v) (octilfenoxipolietoxietanol), inhibidor de metaloproteasas a una concentración de 1 μM a 25 mM (valor preferido de 5 mM de EDTA) e inhibidor de proteasas (valor preferido de 0,35 ml/l del inhibidor de las serina proteasas (fluoruro de fenilmetanosulfonilo al 5% en etanol al 100%)). Al recipiente se le añaden antibióticos/antimicóticos a 50-100 U/ml o 50-100 $\mu\text{g/ml}$ en función del agente (el uso preferido son 5 ml/l de una solución a 100 \times de penicilina/estreptomina con una concentración madre de 10 000 U/ml / 10 000 mg/ml). El recipiente se deja mezclar con suavidad en una bandeja de agitación (a 40-65 rpm), $T = 20-25^\circ\text{C}$, durante 36 horas con cambio con una solución recién preparada cada 12 horas. Esta etapa del tratamiento está diseñada para retirar las membranas celulares y los componentes del citoesqueleto.

35 En algunos aspectos, se decanta la solución de gran salinidad anterior y se reemplaza por una relación de volumen de solución por tejido de 50:1 (valor preferido de 300 ml) de agua desionizada estéril. Los especímenes se enjuagan durante 30 minutos. Después de enjuagar con agua desionizada estéril, se reemplaza por una relación de volumen de solución por tejido de 50:1 (valor preferido de 300 ml) del tampón fisiológico de Hanks/HEPES (cloruro de sodio a 0,14 M, cloruro de potasio a 5,4 mM, fosfato dibásico de sodio a 0,26 mM, fosfato monobásico de potasio a 0,44 mM, bicarbonato de sodio a 4,2 mM, sal de sodio de HEPES a 10 mM, cloruro de calcio dihidratado a 8,3 mM, sulfato de magnesio heptahidratado a 0,2 mM y cloruro de magnesio hexahidratado a 0,25 mM). Esta solución se ajusta a pH 7,35 con el uso de HCl/NaOH a 2 M antes del uso). Los especímenes se enjuagan en el tampón fisiológico durante 30 minutos.

45 En algunos aspectos, después de este enjuague, se decanta el tampón fisiológico y se reemplaza por 200 ml de tampón fisiológico de Hanks/HEPES. A esto se le añaden endonucleasas, preferiblemente ADNasa y ARNasa, a las cantidades preferidas de 1330 μl de la reserva de desoxirribonucleasa (tipo II de páncreas bovino, 13,3 U/ μl de la solución a pH 7,3 en NaCl/glicerol) y 1330 μl de la reserva de ribonucleasa (tipo III-A de páncreas bovino, 85 $\mu\text{g/ml}$). A continuación, el tejido se coloca en un baño María con agitación, se mezcla con suavidad (45-60 rpm) a 37°C durante 5 horas. Después de 5 horas, se decanta la solución y se reemplaza por tampón fisiológico de Hanks/HEPES, con un breve enjuague del tejido. Esta etapa del proceso está diseñada para degradar el ADN y el ARN para facilitar su posterior retirada.

En algunos aspectos, se decanta el enjuague previo con el tampón fisiológico y se reemplaza por 300 ml de una solución tamponada con Tris a 50 mM ajustada a pH 9 y que contiene fosfato de tri-n-butilo (TnBP) al 1% (v/v). A continuación, al recipiente se le añaden 1,5 ml de una solución a 100× de antibiótico/antimicótico penicilina/estreptomicina (concentración madre de 10 000 U/ml / 10 000 mg/ml). Esta etapa del tratamiento de descelerización también se puede realizar con una solución hecha de TnBP al 1% (v/v) en etanol al 70% sin antibióticos/antimicóticos. A continuación, el tejido se mezcla con suavidad en una bandeja de agitación (45-60 rpm) a T = 20-25 °C durante 48 horas con cambios con la solución recién preparada cada 12 horas. Esta etapa está diseñada para retirar además cualquier remanente de componentes celulares (proteínas del citoesqueleto, ADN, ARN) ya que el TnBP es un disolvente caótopo de «tipo tensioactivo». Además, se ha demostrado que el TnBP desactiva los virus.

En algunos aspectos, después del tratamiento, se decanta la solución y se renueva con 300 ml de la solución tamponada con Tris a 50 mM ajustada a pH 9 (que no contiene TnBP). Se le añade la misma cantidad de la solución de antibiótico/antimicótico (penicilina/estreptomicina) anteriormente usada y el recipiente se deja mezclar con suavidad en una bandeja de agitación (a 40-65 rpm), T = 20-25 °C, durante 24 horas con cambio con solución recién preparada a las 12 horas.

En algunos aspectos, se decanta la solución anterior de tampón de Tris a pH 9 y se reemplaza por 300 ml de una solución de ácido peracético (PAA) al 1% (v/v) en etanol (la solución de PAA consistía en ácido peracético al 2%, etanol al 100% y agua estéril (relación v/v/v 2/1/1), lo que proporciona una solución de esterilización final de PAA al 1%) durante 4 horas, se mezcla con suavidad en una bandeja de agitación (a 40-65 rpm), a T = 20-40 °C. Después del tratamiento con PAA, la solución salina recién preparada y estéril tamponada con fosfato (PBS, que contiene cloruro de sodio al 0,14 M, cloruro de potasio a 2,7 mM, fosfato dibásico de sodio a 6,5 mM, fosfato monobásico de potasio a 1,5 mM y se ajusta a pH 7,4). Se le añade la misma cantidad de la solución de antibiótico/antimicótico (penicilina/estreptomicina) utilizada previamente y el recipiente se deja mezclar con suavidad en una bandeja de agitación (a 40-65 rpm), T = 20-25 °C, durante 12 horas. Después, el espécimen se enjuaga dos veces durante 30 minutos cada vez con 300 ml de la solución salina tamponada con fosfato estéril y recién preparada a temperatura ambiente que no contiene ningún antibiótico/antimicótico.

En algunos aspectos, se embotella cada pieza de tejido en condiciones estériles con una relación mínima de volumen de solución por tejido de 20:1 a 50:1 en (i) solución salina tamponada con fosfato estéril y recién preparada introducida por infusión con la solución de penicilina/estreptomicina (6 ml/l de la solución a 100× con una concentración madre de 10 000 U/ml / 10 000 mg/ml), o bien (ii) etanol al 70%, y se conserva a 4 °C.

30 Detergentes

Los detergentes o tensioactivos son críticos para el éxito de muchas estrategias de descelerización. Se pueden utilizar diferentes detergentes de acuerdo con los presentes métodos. Los detergentes son útiles para la descelerización cuando se añaden en una concentración suficiente para formar micelas. Una micela es una aglomeración de monómeros de detergente, que a menudo son esféricas, que están orientadas de tal manera que los dominios apolares de las moléculas de detergente interactúan en el interior, y cuyos los dominios polares interactúan en el exterior con moléculas de agua. La concentración a la cual los detergentes forman micelas se denomina la concentración micelar crítica (CMC). La CMC varía con las condiciones de descelerización, entre ellas la fuerza iónica, el pH, la temperatura y la presencia de proteínas y lípidos (entre ellos otras moléculas de detergentes). Las micelas ocupan espacio en el entorno acuoso y, como tales, pueden destruir los enlaces de hidrógeno entre las moléculas de agua. Durante la descelerización, la extracción de los componentes celulares, entre ellos los lípidos y las proteínas del tejido, se lleva a cabo cuando estas micelas entran en el tejido, disuelven los componentes apolares y se eliminan con cambios de la solución.

Los detergentes se pueden clasificar en una de estas tres designaciones: iónico, no iónico y zwitteriónico. Los detergentes iónicos son aniónicos o bien catiónicos, aunque los detergentes catiónicos no se utilizan en los procedimientos de descelerización debido a su fuerte tendencia a provocar la desnaturalización. Un subgrupo de detergentes iónicos son las sales de los ácidos biliares, que se encuentran en el intestino para solubilizar las grasas. Los ácidos biliares son más suaves que otros detergentes aniónicos, tales como el SDS. Los detergentes no iónicos, tales como Triton X-100®, tienen grupos neutros en la cabeza polar y no son desnaturalizantes para las proteínas. Los detergentes no iónicos rompen las interacciones entre lípidos y entre lípido y proteína. Finalmente, los detergentes zwitteriónicos, tales como CHAPS, tienen propiedades tanto de los detergentes iónicos como de los no iónicos. Los detergentes zwitteriónicos son por lo general más suaves que los detergentes iónicos y más desnaturalizantes para las proteínas que los detergentes no iónicos.

Disolventes

Para la destrucción de las interacciones entre proteína y lípido al desestabilizar las interacciones hidrófobas se pueden utilizar diferentes disolventes de acuerdo con los presentes métodos. En algunos aspectos, se utiliza el fosfato de tri-n-butilo (TnBP). Un beneficio añadido al uso del TnBP en un protocolo de descelerización es su probada acción antiviral (Horowitz et al., *Blood*, 79: 826-831 (1992); Horowitz et al., *Dev. Biol. Stand.*, 81: 147-161 (1993)). En otros aspectos de los presentes métodos, se puede utilizar cualquier otro disolvente que muestre un buen comportamiento

con respecto a la descelularización, con muy poco daño sobre la matriz extracelular (Woods, M Sc Thesis, Dalhousie University, Halifax NS, Canadá (2002); Woods et al, *Biomaterials*, 26; 7339-7349 (2005)).

Protección contra las proteasas y tratamientos con antibióticos/antivíricos

5 Durante la descelularización, las células lisadas liberan el contenido de los lisosomas en el espacio extracelular. Muchas de las enzimas liberadas, en especial las proteasas, son muy eficaces a la hora de degradar la matriz extracelular. Un objetivo de la descelularización es conservar la matriz extracelular intacta al mismo tiempo que se retiran los componentes celulares, por lo que resulta contraproducente la acción de las enzimas de degradación. En diferentes aspectos de la presente descripción, los inhibidores de proteasas están presentes en el procedimiento durante la fase inicial de la lisis celular. En otros aspectos de la presente descripción, los inhibidores de proteasas están además presentes durante las fases posteriores del proceso de descelularización.

10 De acuerdo con la presente descripción, la inhibición de las proteasas se puede conseguir mediante una combinación de métodos. En determinados aspectos, las proteasas del lisosoma se inhiben con el uso de un pH elevado (aproximadamente pH 8). En otros aspectos, también se utilizan los quelantes que se fijan a los cofactores metálicos de las enzimas, tales como magnesio, hierro o zinc (p. ej., EDTA o 1,10-fenantrolina). En diferentes aspectos, la inhibición química de las proteasas se puede conseguir mediante la adición de alguno de los inhibidores de proteasas habituales. Los inhibidores químicos de acuerdo con los presentes métodos pueden incluir fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF), aprotinina o leupeptina. El PMSF (fijación irreversible) y la aprotinina (fijación reversible) inhiben las serina proteasas, tales como la tripsina y la quimotripsina, mientras que la leupeptina (poco estable en los entornos acuosos) inhibe tanto las serina proteasas como las cisteína proteasas.

20 De acuerdo con determinados aspectos de la presente descripción, se dan a conocer métodos para la inhibición de bacterias. La inhibición de las bacterias es beneficiosa en parte porque el procedimiento de descelularización no se realiza por lo general de manera aséptica. En diferentes aspectos, se utilizan los antibióticos habituales que se utilizan para los tratamientos de descelularización y pueden incluir inhibidores de la síntesis de la pared celular de las bacterias grampositivas (p. ej., penicilina o vancomicina), inhibidores de la síntesis de proteínas de bacterias y micoplasmas (p. ej., estreptomycin y gentamicina) y agentes que inducen codificaciones erróneas en los ribosomas de las bacterias grampositivas/gramnegativas y en los micoplasmas (kanamicina). En otros aspectos, también se añade azida de sodio (NaN₃) a las soluciones de descelularización para inhibir el crecimiento microbiano.

30 En algunos aspectos, una o varias de las soluciones utilizadas en los métodos descritos en la presente descripción comprenden además al menos un agente reductor de biocarga. En otros aspectos, el agente reductor de biocarga es penicilina, estreptomycin, ácido peracético o una combinación de los mismos.

35 El uso de aloinjertos y xenotrasplantes es complicado debido al potencial de transmisión de enfermedades. Muchos tejidos porcinos contiene el retrovirus endógeno porcino (PERV), incluso después de la descelularización (Leyh et al., *J Thorac Cardiovasc Surg*, 126: 1000-1004 (2003); Walles et al., *Eur. J. Cardiothorac Surg*, 24: 358-363 (2003)). Así pues, en determinados aspectos, se dan a conocer métodos para eliminar los virus. En otros aspectos, los tratamientos con ácido peracético y/o etanol se utilizan junto con la descelularización para la eliminación de los virus (Hodde et al., *Biotechnol Bioeng*, 79: 211-216 (2002)). En otros aspectos, el disolvente orgánico TnBP se emplea con el propósito adicional de disminuir la presencia de virus (p. ej., virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)) (Horowitz et al., *Blood*, 79: 826-831 (1992); Horowitz et al., *Dev Biol Stand*, 81: 147-161 (1993)). En otros aspectos, los detergentes aniónicos tienen el efecto de hacer disminuir la presencia de virus (p. ej., VIH y otros virus con envuelta) (Luscher-Mattli, *Antivir Chem Chemother*, 11: 249-259 (2000); Cserhati et al., *Environment International*, 28: 337-348 (2002)). En determinados aspectos, la matriz extracelular se carga con inhibidores de proteasas, antibióticos y antivíricos al final del procedimiento de descelularización.

La tabla A da a conocer ejemplos de una serie de reactivos y técnicas que se pueden utilizar de acuerdo con la presente descripción junto con sus correspondientes modos de acción.

Tabla A	Modo de acción
MÉTODOS FÍSICOS	
Gradiente osmótico	Estalla o contrae las células, desorganiza las membranas celulares
Congelación y descongelación	Desorganiza las membranas celulares
Deslaminación mecánica	Separa las capas de tejido a lo largo de planos naturales de disección
Agitación/Compresión	Incrementa la exposición de las membranas celulares a las soluciones de extracción
MÉTODOS QUÍMICOS	

Detergentes aniónicos	
<i>Sal de ácido biliar</i>	
Desoxicolato de sodio	Solubiliza los fosfolípidos Desorganiza las interacciones entre proteínas y lípidos No suele ser desnaturizante, suave
<i>Sintéticos</i>	
SDS (dodecilsulfato de sodio)	Desorganiza las interacciones entre proteínas Desnaturaliza y solubiliza las proteínas Se fija a partículas de virus (incluido el VIH)
Triton X-200® (sulfonato de poliéter de alquilarilo)	Solubiliza los componentes celulares
Sarcosinato de <i>N</i> -lauroilo	Rompe las células Solubiliza las proteínas de la membrana celular
Detergentes no iónicos	
Triton X-100® (éter de PEG y <i>tert</i> -octilfenilo)	Solubilización no desnaturizante de proteínas
Tween 20® u 80® (monolaurato/oleato de PEG y sorbitano)	Solubiliza las proteínas periféricas de la membrana
Igepal CA630 (antiguamente vendido como Nonidet P40) (octilfenil-PEG)	Solubilización no desnaturizante de proteínas
<i>N</i> -Octil-β-D-glucopiranosido	Solubilización de las proteínas de la membrana
Detergentes zwitteriónicos	
Sulfobetaina 10 y 16	Ayuda a disminuir el tamaño de las micelas con detergentes aniónicos Conserva la naturaleza zwitteriónica a lo largo de un amplio margen de pH
CHAPS	Desorganiza las interacciones entre proteínas No desnaturizante, forma micelas pequeñas
Alcoholes	
Glicerol	Destruye las bacterias Solubiliza los componentes celulares
Isopropanol	Desorganiza las membranas celulares, disuelve los lípidos Destruye las bacterias y los virus
Etanol	Destruye las bacterias
1-Butanol	Extrae los lípidos
Disolventes orgánicos	
fosfato de tri(<i>n</i> -butilo) (TnBP)	Desorganiza las interacciones entre proteínas, suave [65] Retira las partículas de virus (incluido el VIH)
Ácidos	
HCl, H ₂ SO ₄	Solubiliza las células
Ácido peracético	Destruye los virus, solubiliza los remanentes celulares
Bases	
NaOH	Desorganiza el ADN/ARN y las membranas celulares Destruye los virus, inactiva los priones [167]
NH ₄ OH	Debilita los enlaces entre lípidos y proteínas
Quelantes	
EDTA EGTA	Se fija a cofactores metálicos, inhibe enzimas Se fija a los iones celulares necesarios para unirse a los sustratos

MÉTODOS BIOQUÍMICOS	
Enzimas de membrana/adhesión	
Tripsina	Desorganiza los desmosomas, adhesiones focales Escinde los enlaces peptídicos en Arg y Lys
DISPASA DISPASA II	Ataca el colágeno de tipo IV, ayuda a levantar las células
Fosfolipasa	Digiere los fosfolípidos de las membranas celulares
Enzimas que actúan selectivamente sobre antígenos	
Termolisina	Ataca el antígeno en el hemidesmosoma de la capa basal de los queratinocitos
α -galactosidasa	Digiere el antígeno de tipo α -1,3-galactosa
Exonucleasas	
ADNasa I	Facilita la hidrólisis desde los extremos de las hebras de ADN
ARNasa A	Facilita la hidrólisis desde los extremos de las hebras de ARN
Endonucleasas	
Benzonasa	Facilita la degradación de los enlaces internos en el ADN (monocatenario y bicatenario) y en el ARN

5 Los tejidos idóneos para ser usados en el presente método incluyen los adecuados para la implantación. Los tejidos pueden tener un origen humano. El tejido se suele descelularizar antes de cualquier fijación. En determinados aspectos, el tejido puede ser una parte blanda. El método de descelularización es aplicable a diferentes tejidos, entre ellos válvulas cardíacas, tendones, ligamentos, arterias, venas, diafragmas, pericardio, aponeurosis, duramadre, tímpanos, conductos aórticos, dermis, cartílago o cualquier otro tejido idóneo.

De acuerdo con un aspecto, la presente descripción da a conocer métodos para producir un tejido bioprotésico, en donde el tejido es un tejido de humano.

10 De acuerdo con un aspecto, la presente descripción da a conocer métodos para producir un tejido bioprotésico, en donde el tejido es una parte blanda. En otros aspectos, la parte blanda es una válvula cardíaca, tendón, ligamento, arteria, vena, diafragma, pericardio, aponeurosis, duramadre, tímpano, conducto aórtico, dermis o cartílago. En algunos aspectos, el tejido es la dermis. En determinados aspectos, el tejido es piel alógena de humano.

15 Las bioprótesis producidas de acuerdo con la presente descripción se pueden utilizar como remplazos para tejidos defectuosos en mamíferos, en particular en los humanos. En la técnica se conocen bien los métodos para efectuar el remplazo de, por ejemplo, válvulas cardíacas, tendones, ligamentos, vasos, etc.

20 En determinados aspectos, los presentes métodos se aplican a la descelularización de la piel. El uso clínico actual de la piel para aloinjerto de grosor parcial se limita a un vendaje temporal para el tratamiento de quemaduras graves. La respuesta inmunitaria del paciente da lugar al rechazo de la piel y la necesidad de otros tratamientos y procedimientos de injerto. El procedimiento de descelularización permitirá un recubrimiento prolongado e incluso la integración y remodelación en el huésped. La eliminación de «biocarga» incrementa significativamente el suministro de piel disponible para trasplantes.

Ensayos de descelularización

25 La extensión de la descelularización se puede determinar mediante histoquímica, por ejemplo, por la tinción del tejido con hematoxilina y eosina al hacer uso de las técnicas estándares. La tinción inmunohistoquímica se puede utilizar también, por ejemplo, para visualizar los marcadores específicos de célula, tales como la actina β y los antígenos de histocompatibilidad, en donde la ausencia de tales marcadores es una indicación más de la descelularización. En determinados aspectos, la tinción inmunohistoquímica con anticuerpos se puede utilizar para identificar los inmunógenos específicos asociados al rechazo (p. ej., HLA-DR) y la retirada del ADN celular por debajo de los niveles de detección de los métodos de análisis actuales.

30 En diferentes aspectos, los métodos de la presente descripción producen tejido, en donde el tejido se caracteriza por

una ausencia sustancial de tinción positiva para los núcleos celulares.

En diferentes aspectos, los métodos de la presente descripción producen tejido, en donde el tejido se caracteriza por una ausencia sustancial de ADN celular.

5 En diferentes aspectos, los métodos de la presente descripción producen tejido, en donde el tejido se caracteriza por una ausencia sustancial de proteínas inmunógenas. En otros aspectos, la proteína inmunógena es HLA-DR. En otros aspectos, la proteína inmunógena es HLA-A,B,C.

En diferentes aspectos, los métodos de la presente descripción producen tejido, en donde el tejido se caracteriza por una reducción de más del 70-80, 70, 80, 90, 95 o 99%, de la cantidad de proteínas del citoesqueleto. En otros aspectos, las proteínas del citoesqueleto son vimentina, actina β , actina α , miosina, tubulina y vinculina.

10 Tejido

Los tejidos idóneos para ser usados en el presente método incluyen los idóneos para la implantación en los humanos. Los tejidos pueden tener un origen de humano. Por lo general, el tejido se descelulariza antes de cualquier fijación u otro uso. En determinados aspectos, el tejido puede ser una parte blanda. Los tejidos pueden incluir piel, válvulas cardíacas, tendones, ligamentos, arterias, venas, diafragmas, pericardio, aponeurosis, duramadre, tímpano, conductos aórticos, dermis, cartílago o cualquier otro tejido idóneo.

15

En algunos aspectos, el tejido es un tejido de humano. En algunos aspectos, el tejido es una parte blanda. En otros aspectos, la parte blanda es una válvula cardíaca, tendón, ligamento, arteria, vena, diafragma, pericardio, aponeurosis, duramadre, tímpano, conducto aórtico, dermis o cartílago. En determinados aspectos, el tejido es dermis. En determinados aspectos, el tejido es piel alógena de humano.

20

Las bioprótesis producidas de acuerdo con la presente descripción se pueden utilizar como remplazos para tejidos defectuosos en los mamíferos, en particular en los humanos. En la técnica se conocen bien los métodos para efectuar el remplazo de, por ejemplo, válvulas cardíacas, tendones, ligamentos, vasos, etc.

25

En algunos aspectos, un tejido está sustancialmente libre de ácidos nucleicos. En algunos aspectos, un tejido está libre de al menos el 90, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de los ácidos nucleicos. En algunos aspectos, el ácido nucleico es ARN. En algunos aspectos, el ácido nucleico es ADN. En algunos aspectos, el tejido tiene menos de 0,5 ng de ADN por miligramo de peso seco de tejido. En algunos aspectos, el tejido tiene menos de 0,5 ng de ADN por miligramo de peso seco de tejido según se mide con un ensayo de ADN PicoGreen®.

30

En algunos aspectos, un tejido está sustancialmente libre de una o varias moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). En algunos aspectos, un tejido está libre de al menos el 90, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de una o varias moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). En algunos aspectos, el CMH es el HLA-DR. En algunos aspectos, el tejido está sustancialmente libre de HLA-DR, según se mide por inmunohistoquímica. En algunos aspectos, el CMH es el HLA-A,B,C. En algunos aspectos, el tejido está sustancialmente libre de HLA-A,B,C, según se mide por inmunohistoquímica.

35

En algunos aspectos, un tejido está sustancialmente libre de uno o varios microorganismos. En algunos aspectos, un tejido está libre de menos del 90, el 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100%, de uno o varios microorganismos. En algunos aspectos, uno o varios microorganismos incluyen bacterias, virus y hongos. En algunos aspectos, el uno o varios microorganismos es una bacteria. En algunos aspectos, la bacteria es una bacteria de *Staphylococcus aureus*, una bacteria de *Streptococcus pyogenes*, una bacteria de *Enterococcus* o una bacteria de *Bacillus subtilis*. En algunos aspectos, la bacteria es una bacteria de tipo *Staphylococcus*, una bacteria de tipo *Streptococcus*, una bacteria de tipo *Enterococcus* o una bacteria de tipo *Bacillus*. En algunos aspectos, la presencia o ausencia de *Bacillus* es un sustituto aceptado para la presencia o ausencia de *Clostridium* debido a sus propiedades indeseables y a su mayor riesgo. En algunos aspectos, la esterilidad del tejido se consigue después de alcanzar una reducción de 6 unidades logarítmicas en base 10 de las especies bacterianas de acuerdo con los estándares internacionales conocidos. En algunos aspectos, el tejido está sustancialmente libre de hongos.

45

En algunos aspectos, un tejido está sustancialmente libre de uno o varios componentes celulares. En algunos aspectos, un tejido está libre de al menos el 50, el 50, 60, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100%, de uno o varios componentes celulares. En algunos aspectos, uno o varios componentes celulares incluyen una o varias proteínas del citoesqueleto. En algunos aspectos, una o varias proteínas del citoesqueleto pueden incluir vimentina, actina β , actina α , miosina, tubulina y/o vinculina. En algunos aspectos, una o varias proteínas del citoesqueleto incluyen la actina β . En algunos aspectos, el tejido está sustancialmente libre de actina β , según se mide por inmunohistoquímica. En algunos aspectos, la una o varias proteínas del citoesqueleto incluyen la vimentina. En algunos aspectos, el tejido está sustancialmente libre de vimentina, según se mide por inmunohistoquímica.

50

55

En algunos aspectos, el tejido comprende elastina. En algunos aspectos, el tejido comprende elastina, según se mide mediante histología al hacer uso de la tinción de Van Gieson. En algunos aspectos, el tejido comprende uno o varios

proteogluanos. En algunos aspectos, el tejido comprende uno o varios proteogluanos según se mide mediante histología al hacer uso de la tinción tricrómica de Masson.

En algunos aspectos, la estructura de colágeno del tejido no está sustancialmente alterada en comparación con un tejido de control en fresco. En algunos aspectos, la estructura de colágeno del tejido no está sustancialmente alterada en comparación con un tejido de control en fresco según se valora mediante la estabilidad térmica del colágeno. En algunos aspectos, la temperatura de desnaturalización del tejido no está sustancialmente alterada en comparación con un tejido de control en fresco. En algunos aspectos, la temperatura de desnaturalización del tejido es de aproximadamente 60, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, aproximadamente 70 o 70 °C. En algunos aspectos, la temperatura de desnaturalización del tejido se mide mediante una prueba de la tensión hidrotérmica isométrica (THI).

Kits

En algunas realizaciones, la invención da a conocer además kits que comprenden los tejidos y/o composiciones descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, la invención da a conocer además kits que comprenden los tejidos descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, un kit puede incluir una o varias de las soluciones descritas en la presente memoria. En algunas realizaciones, un kit puede incluir una solución hipotónica, una primera solución de tensioactivo, una solución de enzimas de tipo nucleasa, una solución de limpieza, y una solución del agente reductor de biocarga. En algunas realizaciones, un kit puede incluir un tejido sin tratar. En algunas realizaciones, un kit puede incluir las instrucciones para la descelularización de un tejido sin tratar. En algunas realizaciones, un kit puede incluir las instrucciones para el uso de una o varias soluciones descritas en la presente memoria. En algunas realizaciones, un kit puede incluir las instrucciones para el tratamiento de un tejido sin tratar con una o varias de las soluciones descritas en la presente memoria. En algunas realizaciones, un kit puede incluir las instrucciones para utilizar las soluciones descritas en la presente memoria en un método descrito en la presente memoria.

En una realización, la invención da a conocer un kit que comprende una composición de la invención, p. ej., una composición que comprende el tejido descelularizado en una solución, en un recipiente etiquetado adecuadamente. En determinadas realizaciones, tales kits comprenden uno o varios recipientes cada uno con su etiqueta que contienen alícuotas de la composición en dosis unitarias o en dosis múltiples, útil para administrar una cantidad definida de la composición a un individuo. El kit puede comprender además instrucciones para administrar las composiciones de la invención a un individuo, lo que incluye, p. ej., las instrucciones sobre la manera de trasplantar el tejido.

En una realización, la invención da a conocer un kit que comprende una o varias soluciones de la invención en un recipiente etiquetado adecuadamente. En determinadas realizaciones, tales kits comprenden uno o varios recipientes cada uno con su etiqueta que contienen alícuotas de dosis unitarias o de dosis múltiples de una o varias soluciones, útiles para preparar una cantidad definida del tejido para ser usado en un individuo. El kit puede comprender además instrucciones para poner en contacto un tejido con una o varias de las soluciones. En algunas realizaciones, un kit puede incluir instrucciones para llevar a cabo uno o varios de los métodos descritos en la presente memoria, p. ej., los métodos descritos en las reivindicaciones que se han registrado.

El recipiente en el cual los componentes del kit se manipulan y venden puede estar etiquetado según los estándares aplicables de la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos.

Ejemplos

A continuación, se encuentran ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen solo con el propósito de ilustrar y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención de ninguna manera. Se han hecho esfuerzos para garantizar la exactitud con respecto a los números utilizados (p. ej., cantidades, temperaturas, etc.), pero sin descartar algún error experimental y desviación, por supuesto.

La puesta en práctica de estas realizaciones de la presente invención empleará, a menos que se indique de otra manera, los métodos convencionales de la química de proteínas, bioquímica, técnicas de ADN recombinante y farmacología, dentro de los conocimientos de la técnica. Tales técnicas se explican con detalle en la bibliografía. Véase, p. ej., T. E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W. H. Freeman and Company, 1993); A. L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., edición actual); Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2.ª edición, 1989); *Methods in Enzymology* (S. Colowick y N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18.ª edición (Easton Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey y Sundberg, *Advanced Organic Chemistry*, 3.ª ed., (Plenum Press), vol. A y B (1992).

Ejemplo 1: Descelularización de la piel de humano

Materiales y métodos

Protocolo de descelularización

Se consiguió la piel humana recién congelada de 6 donantes (n = 6), se descongeló a temperatura ambiente en su

envase y se preparó para el tratamiento. El grado de preparación del tejido dependió de la calidad de la piel obtenida, pero por lo general implicó la retirada de los elementos ajenos al tejido y cortar el tejido al tamaño adecuado. El tamaño de la piel utilizada fue de 4 cm × 5 cm y los tejidos se trataron con una relación mínima de volumen por tejido de 50:1 a menos que se indique de otra manera. Para este ejemplo, se trataron tres especímenes de piel humana en un recipiente. Todas las sustancias químicas se obtuvieron de Sigma-Aldrich, a menos que se indique de otra manera, y los números de producto se dan a conocer entre paréntesis.

El protocolo básico de descelularización seguido se esboza en la figura 1. Esta primera etapa del tratamiento de descelularización se diseñó para (i) hacer que las células del tejido absorban agua (condiciones hipotónicas) y acaben estallando, y (ii) hacer que la capa epidérmica intacta se separe de la dermis subyacente al mismo tiempo que se deja intacta la membrana basal. Los especímenes de la piel humana recién obtenidos se transfirieron a un frasco de polipropileno provisto de tapón que contiene 300 ml de una solución hipotónica que contiene el tampón de Tris a 10 mM (base de Trizma®, T87602) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, E9884) a 5 mM como inhibidor de metaloproteasas. Esta solución se ajustó a pH = 8 con HCl/NaOH antes de su uso. A este recipiente se le añadieron 5 ml/l de una solución a 100× de penicilina/estreptomicina (A5955, concentración madre de 10 000 U/ml / 10 000 mg/ml) y 0,35 ml/l de una solución concentrada (5% p/v en etanol al 100%) del inhibidor de serina proteasas fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF, P7626). A continuación, el recipiente se dejó mezclar con suavidad en una bandeja de agitación a 40-65 rpm, T = 20-25 °C, durante 24 horas con cambio con una solución recién preparada a las 12 horas. Durante las primeras 12 horas de tratamiento, la epidermis de las muestras de piel se liberó de la dermis subyacente y se retiró del recipiente cuando se recambió la solución.

La siguiente etapa del tratamiento se diseñó para retirar las membranas celulares y los componentes del citoesqueleto. Se decantó la solución hipotónica y se reemplazó por 300 ml de una solución de gran salinidad que contenía cloruro de potasio a 5 M (KCl, P9541), tampón de Tris (T87602) a 50 mM que contenía el 1% (v/v) de Triton X-100 (octilfenoxipoliétoxietanol, T9284), y un inhibidor de metaloproteasas (5 mM de EDTA, E9884). Esta solución se ajustó a pH = 8 con HCl/NaOH antes de su uso. A este recipiente se le añadieron 5 ml/l de una solución a 100× de penicilina/estreptomicina (A5955, concentración madre de 10 000 U/ml / 10 000 mg/ml) y 0,35 ml/l de una solución concentrada (5% p/v en etanol al 100%) del inhibidor de serina proteasas fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF, P7626). El recipiente se dejó mezclar con suavidad en una bandeja de agitación (a 40-65 rpm), T = 20-25 °C, durante 36 horas con cambio con solución recién preparada cada 12 horas.

Para garantizar la esterilidad, todo el trabajo a partir de este punto en adelante se realizó en una campana de seguridad biológica de clase II/III al hacer uso de una técnica aséptica. Se decantó la solución de gran salinidad anterior y se reemplazó por 300 ml de agua desionizada y estéril. Los especímenes se enjuagaron durante 30 minutos. Después del enjuague, se decantó el agua desionizada estéril y se reemplazó por 300 ml de tampón fisiológico de Hanks/HEPES estéril (cloruro de sodio (S9625) a 0,14 M, cloruro de potasio (P9541) a 5,4 mM, fosfato dibásico de sodio (S0876) a 0,26 mM, fosfato monobásico de potasio (P5379) a 0,44 mM, bicarbonato de sodio (S8875) a 4,2 mM, sal de sodio de HEPES (H7006) a 10 mM, cloruro de calcio dihidratado (C3881) a 8,3 mM, sulfato de magnesio heptahidratado (M1880) a 0,2 mM y cloruro de magnesio hexahidratado (M0250) a 0,25 mM. Esta solución se ajustó a pH 7,35 con HCl/NaOH antes de su uso. Los especímenes se enjuagaron en el tampón fisiológico de Hanks/HEPES durante 30 minutos.

La siguiente etapa del procedimiento se diseñó para degradar el ADN y el ARN para facilitar su posterior retirada. Se decantó el tampón fisiológico de Hanks/HEPES utilizado para el enjuague y se reemplazó por 200 ml de tampón fisiológico de Hanks/HEPES que contenía 1330 µl de la solución concentrada de desoxirribonucleasa (ADNasa de tipo II de páncreas bovino (D4527)), 13,3 U/µL, en 0,175 g de NaCl (S9625) / 10 ml de glicerol (G7757) / 10 ml de solución de agua estéril ajustada a pH 7,3) y 1330 µl de la solución concentrada de ribonucleasa (ARNasa de tipo III-A de páncreas bovino (R5125)), 85 µg/ml, en 0,03 g de base de Trizma® (T87602) / 0,22 g de NaCl (S9625) / 25 ml de solución de agua estéril ajustada a pH 7,5). A continuación, el tejido se colocó en un baño María con agitación, y se mezcló con suavidad (45-60 rpm) a 37 °C durante 5 horas. Al cabo de 5 horas, se decantó la solución y se reemplazó por tampón fisiológico de Hanks/HEPES estéril recién preparado, y se enjuagó brevemente el tejido.

La siguiente etapa del procedimiento se diseñó para retirar adicionalmente cualquier componente celular restante (proteínas del citoesqueleto, ADN, ARN), ya que el TnBP es un disolvente caótrope de «tipo tensioactivo». Se decantó el enjuague con el tampón fisiológico anterior y se reemplazó por 300 ml de (i) una solución tamponada con Tris a 50 mM (base de Trizma®, T87602) en agua ajustada a pH 9 y que contenía fosfato de tri-n-butilo al 1% (v/v) (TnBP, 158615), 5 ml/l de una solución a 100× de antibiótico/antimicótico de penicilina/estreptomicina (concentración madre de 10 000 U/ml / 10 000 mg/ml) con las muestras indicadas como «descelularización acuosa», o bien (ii) una solución tamponada con Tris a 50 mM (base de Trizma®, T87602) en etanol al 70% ajustada a pH 9 y que contiene fosfato de tri-n-butilo al 1% (v/v) (TnBP, 158615) con las muestras indicadas como «descelularización con etanol». Las muestras del tejido se mezclaron a continuación con suavidad en una bandeja de agitación (45-60 rpm) a T = 20-25 °C durante 48 horas con cambios con la solución recién preparada cada 12 horas.

Después del tratamiento, se decantaron las soluciones y refrescaron con 300 ml de la solución tamponada con tris a 50 mM (base de Trizma®, T87602), ajustada a pH 9 y que contiene 5 ml/l de una solución a 100× de antibiótico/antimicótico de penicilina/estreptomicina (concentración madre de 10 000 U/ml / 10 000 mg/ml). A continuación, el recipiente se dejó mezclar con suavidad en una bandeja de agitación (a 40-65 rpm), T = 20-25 °C,

durante 24 horas con cambio con la solución recién preparada a las 12 horas.

A continuación, se decantó la solución anterior tamponada con tris a pH 9 y se reemplazó por la solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril y recién preparada que contiene cloruro de sodio a 0,14 M (NaCl, S9625), cloruro de potasio a 2,7 mM (KCl, P9541), fosfato dibásico de sodio (S0876) a 6,5 mM, fosfato monobásico de potasio (P5379) a 1,5 mM, ajustado a pH 7,4, y que contiene 5 ml/l de una solución a 100× de antibiótico/antimicótico de penicilina/estreptomicina (concentración madre de 10 000 U/ml / 10 000 mg/ml). El recipiente se dejó mezclar con suavidad en una bandeja de agitación (a 40-65 rpm), T = 20-25 °C, durante 12 horas. Después, los especímenes del tejido se enjuagaron dos veces (30 minutos cada uno) con 300 ml de la solución salina tamponada con fosfato estéril recién preparada que no contiene antibióticos/antimicóticos.

En una etapa final, cada trozo de tejido se embotelló en condiciones estériles en 100 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril y recién preparada en infusión con penicilina/estreptomicina (6 ml/l de la solución a 100× con una concentración madre de 10 000 U/ml / 10 000 mg/ml), etiquetada como «descelularización acuosa» o bien como «descelularización con etanol», y almacenada a 4 °C hasta que se utilizó para los análisis histológicos, inmunohistoquímicos, de contenido de ADN y de tensión hidrotérmica isométrica (THI), tal y como se esboza más adelante.

Histología

Se prepararon muestras para histología de la porción central de cada trozo de piel humana (en fresco, descelularización acuosa, descelularización con etanol). Las muestras se colocaron en formol tamponado con acetato al 10% (Sigma-Aldrich, HT50-1-128) durante 48 horas, después de lo cual se transfirieron a etanol al 100% en la preparación para la inclusión en parafina. Después de la inclusión, las muestras se cortaron con un micrótopo, con el grosor de los cortes fijado en 5 µm. Los cortes se montaron en portaobjetos de vidrio silinado y se secaron durante un mínimo de dos horas. Después del secado, los portaobjetos se sometieron a una serie de etapas de lavado y de tinción con los protocolos para hematoxilina y eosina (tiñe los núcleos celulares de azul y el colágeno de rosa), tricrómico de Masson (tiñe los núcleos celulares de azul/negro, el colágeno y los proteoglicanos de azul/verde), y Verhoff-Van Gieson (tiñe los núcleos celulares de negro, el colágeno de rojo/rosa y las fibras de elastina de negro). Después de estas etapas, se sellaron los cortes y se cubrieron con portaobjetos de vidrio. Para cada muestra, se valoraron dos cortes a lo largo de su longitud completa con objetivos de 10×, 20× y 40×, se grabó una descripción exhaustiva de cada portaobjetos y las imágenes representativas se capturaron con una cámara digital. La piel humana descelularizada preparada con la descelularización acuosa y la descelularización con etanol se comparó con la piel humana en fresco sin tratar (control).

Inmunohistoquímica

Se prepararon cortes de tejido montados en parafina y fijados en formol (grosor de 5 µm) y se desparafinaron con xilenos y etanol. Los portaobjetos se lavaron en la solución salina tamponada con fosfato (PBS) y la retirada del antígeno se realizó con el uso de un tampón con citrato (pH = 6,1) y una olla a presión (HEIR). Después de la retirada del antígeno, las muestras se colocaron a continuación en peróxido de hidrógeno al 2% en PBS durante 10 minutos para bloquear las peroxidases endógenas. Después de un lavado breve con PBS, las muestras se bloquearon con Protein Block (Dako, X0909) durante 10 minutos en una cámara húmeda. A cada muestra se le colocó el anticuerpo primario (25 µl) y se incubó durante 18 horas en una cámara húmeda. Los anticuerpos primarios incluían antivimentina (Dako, M7020, diluciones de 1:40, 1:80), antiactina β (Sigma, A5316, diluciones de 1:2000, 1:4000), anti-HLA-DR (Dako, M0746, diluciones de 1:50, 1:100) y anti-HLA-A,B,C (Abcam, ab70328, diluciones de 1:200, 1:400). Después de la incubación, las muestras se lavaron en PBS y se trataron con Universal LSAB+Kit/HRP (Dako, K0690) para anticuerpos de conejo/cabra/ratón de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras se lavaron con PBS y se reveló el color con el tampón con DAB, cromógeno y sustrato durante 7 minutos. Después de un breve lavado con agua, las muestras se contratiñeron con hematoxilina de Mayer durante 2 minutos, y agua de Scott durante 2 minutos. A continuación, las muestras se deshidrataron (xilenos y etanol) y se montaron con Cytoseal™ y cubreobjetos de vidrio. Por cada muestra se evaluaron dos cortes a lo largo de su longitud total con objetivos de 10×, 20× y 40×; se grabó una descripción exhaustiva de cada portaobjetos. Se capturaron con una cámara digital las imágenes representativas a 20× y 40× y un barrido completo de un corte a 10×. Se creó una composición del barrido completo de un corte al armar un rompecabezas con cada una de las imágenes capturadas a lo largo de la muestra con el objetivo de 10×. La piel humana descelularizada que se preparó con la descelularización acuosa y la descelularización con etanol se comparó con la piel humana en fresco sin tratar. Los controles negativos incluían cortes tratados con omisión de los anticuerpos primarios o secundarios.

Cuantificación del ADN

La cantidad de ADN presente en piel humana en fresco, piel humana tratada con descelularización acuosa y piel humana tratada con descelularización con etanol se determinó con el uso de un ensayo basado en la fluorescencia. Las muestras de tejidos representativos de cada condición de tratamiento se liofilizaron y se pesaron antes del ensayo. Para disociar el ADN del tejido, se digirió con papaína un pequeño trozo de tejido liofilizado (peso seco (p) de 9 a 11 mg) de cada muestra. La solución de digestión con papaína se hizo con la preparación de la solución tamponada

(50 ml del tampón de digestión se prepararon al combinar 0,130 g de acetato de amonio (Sigma-Aldrich, A1542), 0,019 g de Na₂EDTA•2H₂O (Sigma-Aldrich, E5134) y 0,015 g de DL-ditiotreitól (DTT) (Sigma-Aldrich, 43815) en agua destilada con el pH ajustado a 6,2 y la adición de papaína liofilizada (Sigma-Aldrich, P4762) a una concentración de 1 mg/ml. La solución de digestión se añadió a cada muestra a una relación de 100 µl por miligramo de peso seco para normalizar la cantidad de tejido por volumen. Después de la digestión, cada muestra se centrifugó brevemente a 10 000g para retirar el material insoluble o sin digerir. Una pequeña alícuota (50 µl) de cada muestra digerida se analizó con un kit de ensayo Quant-iT PicoGreen (Invitrogen, P7581) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las curvas de calibración se crearon en el margen de 0 a 1000 ng/ml para la piel recién obtenida, y de 0 a 12,5 ng/ml para piel con descelularización acuosa y la piel con descelularización con etanol. La fluorescencia se midió en un lector de placas multipocillo a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 528 nm. Todas las lecturas se realizaron por duplicado y en placas de 96 pocillos negras para impedir la «interferencia» entre los pocillos. Los resultados se normalizaron por el peso seco del tejido analizado para cada muestra.

Prueba de la temperatura hidrotérmica isométrica (THI)

Las muestras se analizaron en un aparato de THI para múltiples muestras hecho a medida, tal y como se describe en Lee et al. [Lee et al. (1995)]. Las muestras se analizaron en grupos, de hasta seis al mismo tiempo. Se utilizaron pinzas con resorte de acero inoxidable para sujetar las muestras (n = 4) de piel en fresco, con descelularización acuosa y con descelularización con etanol (aproximadamente 2,5 cm × 0,5 cm), y dejando aproximadamente 10 cm de tejido entre las sujeciones. Se aplica una carga inicial de 50 g (0,5 N) a cada una de las muestras, suspendidas en un vaso de precipitados de 4 l que contiene agua destilada. A continuación, las muestras se calientan a una velocidad de aproximadamente 1 a 2 °C/min desde la temperatura ambiente hasta una temperatura máxima isotérmica de 90 °C. Las temperaturas se midieron con una sonda termistor localizada centralmente que está colocada a la altura de la mitad de la muestra. Se adquirieron los datos de la carga utilizando las celdas de carga voladizas de tensión calibrada hechas a medida. Las celdas de carga y la sonda de la temperatura se interconectaron con un amplificador de acondicionamiento y tanto la adquisición de datos como el control del sistema se llevaron a cabo en un ordenador personal equipado con una tarjeta de adquisición de datos de 12 bits analógico-digital (modelo NB-MIO-16L; National Instruments) y el programa informático codificado a medida programado con el programa informático LabVIEW 7.1 (National Instruments). Se generaron datos de temperatura-tiempo-carga a lo largo del análisis de THI. Ya que el agua en la que se habían sumergido las muestras se había calentado desde la temperatura ambiente a la máxima de 90 °C, los datos de carga, temperatura y tiempo se capturaron a intervalos de 1 °C. Una medida clave de la estabilidad hidrotérmica del colágeno es la temperatura a la cual se desnaturaliza una triple hélice, su temperatura de desnaturalización (Td). Esta es la temperatura a la cual se ha transferido suficiente energía térmica a la muestra para vencer la barrera energética para desenrollar y permitir el cambio a una nueva conformación de menor energía. En la prueba de THI, las muestras se mantienen en una limitación isométrica, de tal manera que, cuando se añade suficiente energía térmica, las moléculas de colágeno del interior de la muestra son capaces de desenrollarse. Su desenrollamiento real se impide cuando la muestra se mantiene en una limitación isométrica y el ímpetu energético para desenrollarse genera una fuerza tensora que queda registrado como un incremento distintivo de la carga sobre la muestra. Esto crea un acodamiento en el gráfico de carga frente a temperatura y la temperatura a la que comienza este codo se denomina la Td de la muestra. Diferentes regiones, dentro de una muestra de colágeno y dentro de cada una de las moléculas de colágeno para esa materia, tienen diferentes grados de estabilidad térmica. El valor de la Td grabada en este trabajo está, por lo tanto, en función de la estabilidad térmica de todo el colágeno portador de la carga en la muestra durante el análisis.

Estadística para la THI

Se llevaron a cabo comparaciones entre grupos mediante el uso de una prueba ANOVA monofactorial y la prueba de HSD de Tukey-Kramer. Las comparaciones se realizaron a una significación del 95% ($\alpha = 0,05$). Obsérvese que la resolución de la prueba de la THI es de 1 °C y que se estimas prácticamente significativos los cambios de Td de más de, o igual a, 3 °C a partir del tejido (en fresco) de control.

Resultados

Histología

Los cortes de piel de humano en fresco teñidos con hematoxilina y eosina revelaron un empaquetamiento denso del núcleo de las células (azul oscuro) en la epidermis por debajo de la capa queratinizada, y núcleos celulares sueltos y aglomerados a lo largo de la dermis (figura 2). Después de la descelularización mediante las técnicas de descelularización acuosa y de descelularización con etanol, había una ausencia total de tinción de los núcleos celulares según se observó a los aumentos de 100×, 200× y 400× (figura 2). Sin embargo, la estructura de colágeno, teñida de rosa por la eosina, aparecía bien conservada en toda la piel descelularizada.

Los cortes de piel de humano en fresco teñidos con la tinción de Verhoff-Van Gieson revelaron numerosos núcleos celulares negros en la epidermis sin queratinizar, fibras elásticas teñidas intensamente de negro dentro de la epidermis más profunda, y la matriz de colágeno rosa en la dermis (figura 3). Después de la descelularización por todos los métodos, las células de la epidermis ya no eran visibles, aunque la intensidad relativa del colágeno (rosa) y de las

fibras de elastina (negro) de la dermis era similar a la de la piel recién obtenida (figura 3).

La tinción tricrómica de Masson de piel de humano en fresco reveló la presencia de numerosos núcleos celulares teñidos de azul y el citoplasma celular teñido de rojo en la epidermis y en la dermis. Se podían observar rasgos tales como vasos sanguíneos y restos de folículos pilosos. La dermis incluía colágeno, elastina y glucosaminoglucanos teñidos de azul/verde (figura 4). Después de la descelularización mediante todos los tratamientos, no había ningún rastro de tinción azul oscura o roja, lo que indicaba que no estaba presente ninguna célula. Sin embargo, era manifiesta la tinción verde, que indicaba la presencia de colágeno, elastina y glucosaminoglucanos (figura 4).

Inmunohistoquímica

La tinción de piel de humano en fresco para la proteína del citoesqueleto vimentina mediante el uso de anticuerpos monoclonales y peroxidasa reveló células con tinción positiva tanto sueltas como aglomeradas a lo largo del tejido (figuras 5, 7 y 8). Después de la descelularización mediante los protocolos de descelularización acuosa o descelularización con etanol, se redujo significativamente tanto la cantidad como la intensidad de la tinción positiva para la vimentina (figuras 5, 7 y 8). Estaban presentes grandes regiones desprovistas de tinción positiva para la vimentina. Las imágenes de la composición de cortes completos de la piel humana antes y después de la descelularización creadas mediante la toma de imágenes solapantes con 100× aumentos dieron una idea del nivel total de la retirada de la vimentina (figuras 7 y 8).

La piel de humano en fresco teñida con anticuerpos contra la proteína del citoesqueleto actina β reveló una fuerte tinción positiva a lo largo de la epidermis sin queratinizar y una fuerte tinción positiva de células sueltas y aglomeradas a lo largo de la dermis (figura 6, 9 y 10). Después de la descelularización mediante los protocolos de descelularización acuosa y descelularización con etanol, se redujo sustancialmente tanto la cantidad como la intensidad de la tinción positiva para la actina β (figuras 5, 7 y 8). Estaban presentes grandes regiones desprovistas de tinción positiva para la actina β . Las imágenes de la composición de cortes completos de la piel humana antes y después de la descelularización creadas mediante la toma de imágenes solapantes con 100× aumentos dieron una idea del nivel total de la retirada de la actina β (figuras 7 y 8).

Los antígenos de los leucocitos humanos (HLA) HLA-A,B,C y HLA-DR son los principales determinantes del rechazo de aloinjertos de piel. HLA-A,B,C están presentes en todas las células nucleadas del organismo y se demostró que estaban presentes en la epidermis sin queratinizar y en la dermis de la piel de humano en fresco mediante el anticuerpo anti-HLA-A,B,C y la tinción con peroxidasa (figuras 11 y 13). La tinción era muy intensa y recorría todo el tejido. En cambio, no se detectó la presencia de ninguna tinción positiva para HLA-A,B,C a una amplificación de 100×, 200× y 400× en ninguna de las muestras de piel descelularizada (figura 11). El HLA-DR, que está presente en las «células presentadoras de antígeno» del cuerpo humano, fue identificado positivamente sobre todo en la dermis de muestras de piel en fresco (figura 12) gracias al anticuerpo anti-HLA-DR y a la tinción con peroxidasa. En cambio, no se detectó la presencia de ninguna tinción positiva para HLA-DR a una amplificación de 100×, 200× y 400× en ninguna de las muestras de piel descelularizada (figura 12). Las imágenes de composición de cortes completos de piel humana antes y después de la descelularización creadas con la toma de imágenes solapantes con 100× aumentos dieron una idea de la ausencia total de tinción positiva para HLA-A,B,C (figura 13). Esto también representaba el efecto de la descelularización sobre la retirada de HLA-DR y, por lo tanto, no se mostró ninguna composición separada para HLA-DR.

Cuantificación del ADN

El análisis del ADN de la piel de humano en fresco con el uso del kit de análisis Quant-iT PicoGreen (Invitrogen, P7581) reveló un contenido de 650 ± 131 ng/mg (peso seco) del tejido. En cambio, no estaba presente ninguna cantidad detectable de ADN después de la descelularización mediante los protocolos de descelularización acuosa y con etanol (tabla 1). De acuerdo con las instrucciones del fabricante, un nivel de detección por debajo de $<0,5$ ng/mg (peso seco) era posible bajo nuestras condiciones de análisis.

Prueba de la temperatura hidrotérmica isométrica (THI)

Las muestras de piel en fresco mostraban una temperatura de desnaturalización térmica (T_d) de $67,0 \pm 0,4$ °C. La piel descelularizada procesada mediante los protocolos de descelularización acuosa ($T_d = 67,1 \pm 0,8$ °C) o con etanol ($T_d = 65,8 \pm 0,9$ °C) mostró una temperatura de desnaturalización térmica similar (tabla 2). Esto indicó que la estructura del colágeno dentro de la piel no se alteraba con nuestros métodos de descelularización.

Conclusiones

Ambos protocolos de descelularización, la acuosa y con etanol, fueron capaces de producir piel humana muy descelularizada. Los análisis revelaron que el núcleo de las células, las principales proteínas inmunógenas de las células (HLA-DR y HLA-A,B,C) y el contenido de ADN no eran detectables con los métodos descritos. Además, se consiguieron reducciones significativas de las proteínas del citoesqueleto vimentina y actina β en la piel descelularizada. Finalmente, los análisis de termoestabilidad del colágeno revelaron que los métodos de descelularización empleados con la piel de humano conservaban la estructura nativa del colágeno dentro del tejido.

Ejemplo 2: Esterilización de la piel de humano

Los bancos de tejidos procesan y almacenan los aloinjertos mediante el lavado de los tejidos recién obtenidos con soluciones de antibiótico/antimicótico seguido de la criopreservación. Estos procedimientos han demostrado ser inadecuados para la esterilización. Otros han demostrado que la criopreservación daña la estructura del tejido conjuntivo [Kitagawa et al. (2001)]. Otras técnicas de esterilización, tales como el óxido de etileno o la radiación γ , han resultado ser perjudiciales para los injertos de partes blandas y, por lo general, no los usa nadie [Kearney, J. N. (2005); Azar, F. M. (2009)].

De acuerdo con los estándares de la AATB para el depósito de tejidos bajo K2.200 «La piel no se deberá utilizarse para el trasplante si se determina que las siguientes especies están presentes: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* (estrept. de grupo A), *Enterococcus* sp., bacilos gramnegativos, *Clostridium* y hongos (levaduras, mohos)» [AATB (2006); (2008)]. En un estudio de Pianigiani et al. (2009), observaron que los microorganismos responsables de que se descarte el aloinjerto de piel eran todos grampositivos, y que el grupo de organismos aislado con más frecuencia de muestras de preprocesamiento incluía las especies *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Bacillus*. Se seleccionaron cuatro microorganismos para determinar si se pueden retirar y/o destruir mediante nuestros métodos de descelularización basándose en los estándares de la AATB estadounidense: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* (estrept. de grupo A), *Enterococcus* sp. y *Bacillus subtilis* que también se utilizaron como un sustituto de *Clostridium* debido a sus propiedades indeseables, tales como el olor y las condiciones de cultivo anaerobias. *Bacillus* se ha utilizado como un sustituto de *Clostridium* en otros estudios [Stewart, Dunne, Skies y Hoover, (2000)].

Basándose en los estándares internacionales, ISO 11737-1 y 11737-2, y en colaboración con profesionales del campo de la microbiología, se desarrolló un procedimiento normalizado de trabajo (PNT) para la determinación de biocarga. Los experimentos preliminares se realizaron primero para validar el uso de herramientas y técnicas.

Material y métodos

Retirada de la inhibición de piel recién congelada

La piel humana recogida por los bancos depositarios de los tejidos se almacena en una combinación de antibióticos, que incluye cefazolina y gentamicina. Para garantizar la retirada completa de cualquier efecto inhibitorio de la combinación de antibióticos para almacenamiento, se analizaron las muestras congeladas de piel humana recién recogida con un amplio abanico de tiempos de conservación (de 4 a 31 días de conservación). Se prepararon inóculos para los cuatro microorganismos utilizados (*S. aureus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Bacillus*) mediante la obtención, en primer lugar, de una correlación entre la densidad óptica (DO) medida a 620 nm y el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro. Esto se consiguió mediante el ajuste a 1 del valor de la DO medida de 620 nm (el intervalo aceptable iba de 0,85 a 1,15) y la siembra puntual de la solución en placas para comprobar la concentración. Se calculó un factor de concentración/dilución a partir de la correlación y se utilizó para hacer inóculos con 10^8 UFC/ml de una suspensión de bacterias de OD uno.

Los métodos de enjuague con PBS estéril y la mezcla vorticial se eligieron para retirar los antibióticos residuales de los aloinjertos de piel porque estas técnicas tenían un efecto mínimo sobre el número de microorganismos pegados a la piel. La frecuencia de tales tratamientos de lavado dependía del grado de inhibición. Las muestras de piel se sometieron a enjuagues con diferente frecuencia con 10 ml de PBS o tres minutos de mezcla vorticial con 20 ml de PBS. Para comprobar la presencia de cualquier antibiótico inhibitorio después del lavado con PBS, se le añadieron 100 μ l de inóculos con 10^8 UFC/ml a un tubo de centrifugación de 50 ml que contenía piel de humano y 10 ml de PBS estéril. El tubo se mezcló vorticialmente durante un minuto para permitir la liberación de sustancias antimicrobianas desde la piel. La solución de trabajo, que era ya una dilución de 10^{-2} de los inóculos originales con 10^8 UFC/ml, se diluyó mediante diluciones seriadas. De las soluciones diluidas, se realizaron seis siembras puntuales en placas de agar de soja triptica (TSA, por su nombre en inglés) al pipetear 100 μ l de las soluciones con diluciones de 10^{-3} a 10^{-8} . La solución de inóculo también se sembró en puntos sobre las placas directamente con diluciones de 10^{-3} a 10^{-8} para los controles. Las placas de control de los inóculos mostraban con claridad el número de bacterias viables que deben crecer en ausencia de inhibición.

Esterilización de la piel de humano por descelularización

Se obtuvo piel de humano recién congelada de cuatro donantes en total, se descongeló a temperatura ambiente en su envase y se preparó para el tratamiento. De cada donante, se prepararon quince piezas de 4 cm \times 5 cm (que corresponden a 3 muestras para cada uno de los 4 microorganismos que se han de analizar más un control negativo) y una de 2 cm \times 5 cm (para comprobar la biocarga de fondo). Basándose en los resultados de nuestro estudio de inhibición, la piel de humano recién obtenida a inocular con *S. aureus*, *Streptococcus* o utilizada como control negativo se mezcló vorticialmente 6 veces durante 3 minutos con 20 ml de PBS estéril; la piel a inocular con *Enterococcus* y *Bacillus* se mezcló vorticialmente una vez con 20 ml de PBS estéril.

Los inóculos (10^8 UFC/ml) para los cuatro microorganismos utilizados, *S. aureus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Bacillus*, se prepararon según se describió anteriormente en «Retirar la inhibición de la piel recién congelada». En una

campana de seguridad biológica de clase II/III, se añadieron 400 µl en total de cada solución de inóculo en el lado dérmico de la muestras de piel humana designadas (n = 3 por microorganismo) mediante el pipeteo de 100 µl sobre cuatro cuadrantes y la extensión equitativa por la superficie con el uso de una pipeta de transferencia estéril. Como control negativo, se les añadieron a las 3 muestras de piel de humano 400 µl de PBS estéril. Después, los tejidos inculados se dejaron reposar con flujo laminar sin secado (de 60 a 75 minutos) para garantizar la absorción de los inóculos de bacterias. A continuación, las muestras de piel inoculadas se transfirieron a recipientes de 500 ml independientes que corresponden a *S. aureus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* o el control negativo con PBS, en donde cada recipiente contiene tres muestras de 4 cm × 5 cm. Las muestras de piel se trataron luego con la descelularización acuosa o la descelularización con etanol, con o sin el tratamiento con ácido peracético, tal y como se esboza a continuación.

Los especímenes de inoculación de piel de humano en fresco se trataron primero con 300 ml de una solución hipotónica que contenía el tampón de Tris (base de Trizma®, T87602) a 10 mM y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, E9884) a 5 mM como inhibidor de las metaloproteasas. Esta solución se ajustó a pH = 8 con HCl/NaOH antes de su uso. A este recipiente se le añadieron 5 ml/l de una solución a 100× de penicilina/estreptomicina (A5955, concentración madre de 10 000 U/ml / 10 000 mg/ml) y 0,35 ml/l de una solución concentrada (5% p/v en etanol al 100%) del inhibidor de las serina proteasas fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF, P7626). A continuación, el recipiente se dejó mezclar con suavidad en una bandeja de agitación entre 40 y 65 rpm, T = 20-25 °C, durante 24 horas con cambio con solución recién preparada a las 12 horas. Durante las primeras 12 horas de tratamiento, la epidermis de las muestras de la piel se desprende de la dermis subyacente y se retira del recipiente cuando se refresca la solución.

Se decantó la solución hipotónica y se reemplazó por 300 ml de una solución de gran salinidad que contiene cloruro de potasio (KCl, P9541) a 5 M, tampón de Tris (T87602) a 50 mM que contiene Triton X-100 (octilfenoxipolietoxietanol, T9284) al 1% (v/v) y un inhibidor de metaloproteasas (5 mM de EDTA, E9884). Esta solución se ajustó a pH = 8 con HCl/NaOH antes de su uso. A este recipiente se le añadieron 5 ml/l de una solución a 100× de penicilina/estreptomicina (A5955, concentración madre de 10 000 U/ml / 10 000 mg/ml) y 0,35 ml/l de una solución concentrada (5% p/v en etanol al 100%) del inhibidor de serina proteasas fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF, P7626). Se dejó que el recipiente se mezclara con suavidad en una bandeja de agitación (a 40-65 rpm), T = 20-25 °C, durante 36 horas con cambio con la solución recién preparada cada 12 horas.

Para garantizar la esterilidad, todo el trabajo desde este punto en adelante se realizó en una campana de seguridad biológica de clase II/III con el uso de una técnica aséptica. Se decantó la solución de gran salinidad anterior y se reemplazó por 300 ml de agua desionizada estéril. Los especímenes se enjuagaron durante 30 minutos. Después del enjuague, se decantó el agua desionizada estéril y se reemplazó por 300 ml de tampón fisiológico de Hanks/HEPES estéril (cloruro de sodio (S9625) a 0,14 M, cloruro de potasio (P9541) a 5,4 mM, fosfato dibásico de sodio (S0876) a 0,26 mM, fosfato monobásico de potasio (P5379) a 0,44 mM, bicarbonato de sodio (S8875) a 4,2 mM, sal de sodio de HEPES (H7006) a 10 mM, cloruro de calcio dihidratado (C3881) a 8,3 mM, sulfato de magnesio heptahidratado (M1880) a 0,2 mM y cloruro de magnesio hexahidratado (M0250) a 0,25 mM. Esta solución se ajustó a pH 7,35 con HCl/NaOH antes de su uso. Los especímenes se enjuagaron en el tampón fisiológico de Hanks/HEPES durante 30 minutos.

Se decantó el tampón fisiológico de Hanks/HEPES utilizado para el enjuague y se reemplazó por 200 ml del tampón fisiológico de Hanks/HEPES que contenía 1330 µl de la solución concentrada de desoxirribonucleasa (ADNasa de tipo II de páncreas bovino (D4527), 13,3 U/µl, en una solución de 0,175 g de NaCl (S9625) / 10 ml de glicerol (G7757) / 10 ml de agua estéril ajustada a pH 7,3) y 1330 µl de la solución concentrada de ribonucleasa (ARNasa de tipo III-A de páncreas bovino (R5125), 85 µg/ml, en una solución de 0,03 g de base de Trizma® (T87602) / 0,22 g de NaCl (S9625) / 25 ml de agua estéril ajustada a pH 7,5). El tejido se colocó entonces en un baño María con agitación, y se mezcló con suavidad (de 45 a 60 rpm) a 37 °C durante 5 horas. Al cabo de 5 horas, se decantó la solución y se reemplazó por tampón fisiológico de Hanks/HEPES estéril recién preparado y se enjuagó brevemente el tejido.

Se decantó el enjuague con el tampón fisiológico anterior y se reemplazó por 300 ml de (i) una solución tamponada con Tris (base de Trizma®, T87602) a 50 mM en agua ajustada a pH 9 y que contiene fosfato de tri-n-butilo (TnBP, 158615) al 1% (v/v), 5 ml/l de una solución a 100× de antibiótico/antimicótico de penicilina/estreptomicina (concentración madre de 10 000 U/ml / 10 000 mg/ml) cuyas muestras se designan como «descelularización acuosa», o bien (ii) una solución tamponada con Tris (base de Trizma®, T87602) a 50 mM en etanol al 70% ajustada a pH 9 y que contiene fosfato de tri-n-butilo (TnBP, 158615) al 1% (v/v), cuyas muestras se designan como «descelularización con etanol». A continuación, las muestras de tejido se mezclaron con suavidad en una bandeja de agitación (de 45 a 60 rpm) a T = 20-25 °C durante 48 horas con cambios con la solución recién preparada cada 12 horas.

Después del tratamiento, se decantaron las soluciones y se refrescaron con 300 ml de la solución tamponada con Tris (base de Trizma®, T87602) a 50 mM, ajustada a pH 9 y que contenía 5 ml/l de una solución a 100× de antibiótico/antimicótico de penicilina/estreptomicina (concentración madre de 10 000 U/ml / 10 000 mg/ml). A continuación, el recipiente se dejó que se mezclara con suavidad en una bandeja de agitación (a 40-65 rpm), T = 20-25 °C, durante 24 horas con cambio con la solución recién preparada a las 12 horas.

Después se decantó la solución anterior del tampón de Tris a pH 9 y se reemplazó por 300 ml de (i) una solución de

ácido peracético (PAA) al 1% (v/v) en etanol (la solución de PAA consistía en ácido peracético (269336) al 2%, etanol al 100% y agua estéril (proporción v/v/v de 2/1/1), lo que proporciona una solución final de esterilización de PAA al 1%), o bien (ii) directamente en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril y recién preparada que contenía cloruro de sodio (NaCl, S9625) a 0,14 M, cloruro de potasio (KCl, P9541) a 2,7 mM, fosfato dibásico de sodio (S0876) a 6,5 mM, fosfato monobásico de potasio (P5379) a 1,5 mM, ajustado a pH 7,4, y que contiene 5 ml/l de una solución a 100× de antibiótico/antimicótico de penicilina/estreptomicina (concentración madre de 10 000 U/ml / 10 000 mg/ml). El recipiente se dejó que se mezclara con suavidad en una bandeja de agitación (a 40-65 rpm), T = 20-25 °C, durante 12 horas. Después, los especímenes de tejido se enjuagaron dos veces (30 minutos cada una) con 300 ml de la solución salina tamponada con fosfato estéril y recién preparada que no contenía antibióticos/antimicóticos. Para el tratamiento con ácido peracético, las muestras se trataron durante 4 horas, se mezclaron con suavidad en una bandeja de agitación (a 40-65 rpm), a T = 20-40 °C. Después del tratamiento con PAA, las muestras se colocaron en la solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril y recién preparada, ajustada a pH 7,4, y que contenía 5 ml/l de una solución a 100× de antibiótico/antimicótico de penicilina/estreptomicina (concentración madre de 10 000 U/ml / 10 000 mg/ml). El recipiente se dejó que se mezclara con suavidad en una bandeja de agitación (a 40-65 rpm), T = 20-25 °C, durante 12 horas. Después, los especímenes de tejido se enjuagaron dos veces (30 minutos cada uno) con 300 ml de la solución salina tamponada con fosfato estéril y recién preparada que no contenía antibióticos/antimicóticos.

A continuación, las muestras de piel con descelularización acuosa y con descelularización con etanol, con o sin tratamiento con ácido peracético, se analizaron inmediatamente para detectar la presencia de *S. aureus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Bacillus*, tal y como se esboza a continuación. Las muestras inoculadas con PBS estéril servían solo de control negativo.

Detección y enumeración de la biocarga

Se prepararon las muestras (trozos de 2 × 2,5 cm) de piel de humano de cada uno de los recipientes de 500 ml que correspondían a cada método de descelularización (piel con descelularización acuosa y con descelularización con etanol, con o sin tratamiento con ácido peracético) y el microorganismo del inóculo (*S. aureus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* o el control negativo con PBS). Dos muestras de piel por tratamiento, por microorganismo de inóculo, se sembraron directamente en placas de agar de soja tríplica (TSA). Una muestra de piel por tratamiento, por microorganismo de inóculo, se colocó en un tubo de polipropileno de 50 ml para la cuantificación de las bacterias. Al tubo se le añadieron 10 ml de PBS estéril y el tubo se trató con ultrasonidos durante 5 minutos, y se mezcló vorticialmente durante 1 minuto para liberar las bacterias. Se crearon diluciones del sobrenadante (10^{-3} a 10^{-8}) y se sembraron en puntos sobre placas de TSA. La piel «lavada» remanente se transfirió asépticamente a las placas de TSA sin el líquido en exceso para la siembra en placas directa. De acuerdo con las directrices de la AATB [AATB (2006); (2008)], todas las placas se incubaron a 37 °C durante 7 días y se anotó la presencia o la ausencia de las colonias bacterianas.

Además, para corroborar nuestros hallazgos, una muestra de 2 × 2,5 cm de piel humana de cada recipiente de 500 ml que corresponde a cada microorganismo de inóculo (*S. aureus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* o el control negativo con PBS) para la descelularización de la piel por descelularización con etanol con el tratamiento con ácido peracético se enviaron al Departamento de Anatomía Patológica y Medicina de Laboratorio, Autoridad Sanitaria del Distrito de la Capital, Halifax, Nueva Escocia, Canadá, para el análisis de acuerdo con los estándares de la Asociación Estadounidense de Bancos de Tejidos (AATB) (12.ª edición) para la piel de humano. El análisis incluía la detección de bacterias, levadura u hongos. Las muestras se incubaron a 35 °C durante 7 días para las bacterias, y a 30 °C durante 30 días para la levadura o los hongos en sus correspondientes medios, y las lecturas se tomaron todos los días. Si en algún momento se detectaba un crecimiento positivo, se realizaba el subcultivo para identificar la especie del contaminante microbiano.

Como control positivo para demostrar que la piel descelularizada era capaz de dar soporte al crecimiento bacteriano, las muestras de piel descelularizada también se inocularon con cada una de las cuatro especies de bacterias utilizadas en este ensayo. A continuación, las muestras se colocaron en un tubo de polipropileno de 50 ml para la cuantificación de las bacterias. Al tubo se le añadieron 10 ml de PBS estéril y el tubo se trató con ultrasonidos durante 5 minutos y se mezcló vorticialmente durante 1 minuto para liberar las bacterias. Se crearon diluciones del sobrenadante (10^{-3} a 10^{-8}) y se sembraron en puntos sobre placas de TSA. La piel «lavada» remanente se transfirió en asepsia a las placas de TSA sin exceso de líquido para la siembra en placa directa. Las placas se incubaron a 37 °C durante 1 día y se observó la presencia o la ausencia de colonias bacterianas.

Resultados

Controles

En todos los casos, los controles negativos (placas de TSA solo, piel humana inoculada con PBS) no revelaron la presencia de colonias bacterianas. Además, las mediciones del nivel de fondo para *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* (estrept. de grupo A), *Enterococcus* sp. y *Bacillus subtilis* revelaron una ausencia de bacterias. Para los controles positivos, piel humana descelularizada inoculada con cada una de las cuatro especies de bacterias

se demostró que era positiva después de solo 1 día de incubación tanto en las soluciones de lavado como mediante la siembra directa en placa de la piel descelularizada (tabla 4).

Métodos de descelularización

5 La descelularización de la piel de humano mediante los protocolos de descelularización acuosa y con etanol después de la inoculación con 10^8 UFC/ml de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* (estrept. de grupo A), *Enterococcus* sp. y *Bacillus subtilis* se demostró que eliminaba todas las especies excepto *Bacillus subtilis* (datos sin mostrar). Cuando se añadió una etapa de tratamiento con ácido peracético al 1% (v/v) al protocolo de descelularización, se obtuvo la retirada completa de todas las especies microbianas con una reducción de más de 6 unidades logarítmicas en base 10 en la carga bacteriana conseguida, tal y como se muestra por la ausencia total de bacterias en las
10 soluciones de lavado, mediante la siembra directa de la piel lavada (etiquetada como «piel»), y mediante la siembra directa en placas de la piel sin lavar (etiquetada como «siembra directa») (tabla 3).

15 En la tabla 5 se muestran los resultados de la comprobación por parte de terceros (Departamento de Anatomía Patológica y Medicina de Laboratorio, Autoridad Sanitaria del Distrito de la Capital, Halifax, Nueva Escocia, Canadá) de la presencia de microorganismos de acuerdo con las directrices de la Asociación Estadounidense de Bancos de Tejidos (AATB). La descelularización de piel de humano mediante el protocolo de descelularización con etanol con el tratamiento con ácido peracético después de la inoculación con 10^8 UFC/ml de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* (estrept. de grupo A), *Enterococcus* sp. y *Bacillus subtilis* se demostró que retiraba completamente todas las especies microbianas. En ninguna muestra se detectaron bacterias ni hongos.

Conclusiones

20 La descelularización mediante los protocolos de descelularización con etanol o acuosa por sí misma no consiguió la retirada completa de las cuatro especies de bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* (estrept. de grupo A), *Enterococcus* sp., y *Bacillus subtilis*) utilizadas en los inóculos para la piel en fresco. La retirada completa de las cuatro especies bacterianas se obtuvo después de la inclusión de un enjuague con ácido peracético al 1% (v/v) en los protocolos de descelularización que producen un injerto de piel descelularizada humana aceptable para el
25 trasplante de acuerdo con los Estándares de la Asociación Estadounidense de Bancos de Tejidos (AATB) [AATB (2006); (2008)].

Ejemplo 3: Descelularización y esterilización de la aponeurosis de humano

30 Se obtiene la aponeurosis de humano y se prepara para el tratamiento. El grado de preparación del tejido depende de la calidad de la aponeurosis obtenida, pero suele implicar la retirada de los elementos ajenos al tejido y el corte de la aponeurosis al tamaño o tamaños requeridos por los usuarios finales. Para este ejemplo, en un recipiente se tratan tres especímenes de aponeurosis de humano. El tamaño de los especímenes utilizados es de 4 cm × 5 cm y los tejidos se tratan con una relación mínima de volumen de solución por tejido de 50:1. Los especímenes se transfieren a un frasco de polipropileno provisto de una tapa que contiene un volumen preferido de 300 ml de un tampón de Tris hipotónico (<300 mmol/l, valor preferido de 10 mM) y un inhibidor de metaloproteasas a una concentración de 1 μM a
35 25 mM (valor preferido de 5 mM y el inhibidor que se utiliza es el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)). Esta solución se ajusta a pH 7-9 (preferiblemente a pH = 8) con HCl/NaOH antes de su uso. A este recipiente se le añaden antibióticos/antimicóticos a 50-100 U/ml o 50-100 μg/ml en función del agente (preferiblemente se usan 5 ml/l de una solución a 100× de penicilina/estreptomicina con una concentración madre de 10 000 U/ml / 10 000 mg/ml) e inhibidor de proteasas (valor preferido de 0,35 ml/l del inhibidor de serina proteasas (fluoruro de fenilmetanosulfonilo al 5% en etanol al 100%)). El recipiente se deja mezclar con suavidad en una bandeja de agitación a 40-65 rpm, T = 20-25 °C, durante 24 horas con cambio con la solución recién preparada a las 12 horas. Esta etapa se diseñó para hacer que las células del tejido absorban agua (condiciones hipotónicas) y acaben estallando.

45 A continuación, se decanta la solución hipotónica anterior y se reemplaza por una relación mínima de volumen de solución por tejido de 50:1 (preferiblemente 300 ml) de una solución de gran salinidad (valor preferido de 1,5 M de cloruro de potasio con tampón de Tris a 50 mM) que contiene Triton X-100 (octilfenoxipolietoxietanol) al 1% (v/v), inhibidor de metaloproteasas a una concentración de 1 μM a 25 mM (valor preferido de 5 mM de EDTA) y el inhibidor de proteasas (valor preferido de 0,35 ml/l del inhibidor de serina proteasas (fluoruro de fenilmetanosulfonilo al 5% en etanol al 100%)). Al recipiente se le añaden antibióticos/antimicóticos a 50-100 U/ml o 50-100 μg/ml en función del agente (preferiblemente se usan 5 ml/l de una solución a 100× de penicilina/estreptomicina con una concentración madre de 10 000 U/ml / 10 000 mg/ml). El recipiente se deja mezclar con suavidad en una bandeja de agitación (a 40-
50 65 rpm), T = 20-25 °C durante 36 horas con cambios con la solución recién preparada cada 12 horas. Esta etapa del tratamiento está diseñada para retirar las membranas celulares y los componentes del citoesqueleto.

55 Para garantizar la esterilidad, todo el trabajo desde este punto en adelante se lleva a cabo en una campana de seguridad biológica de clase II/III con el uso de la técnica aséptica. Se decanta la solución anterior de gran salinidad y se reemplaza por una relación mínima de volumen de solución por tejido de 50:1 (valor preferido de 300 ml) de agua desionizada y estéril. Los especímenes se enjuagan durante 30 minutos. Después del enjuague con agua desionizada estéril, se reemplaza por una relación mínima de volumen de solución por tejido de 50:1 (valor preferido de 300 ml) del tampón fisiológico de Hanks/HEPES (cloruro de sodio a 0,14 M, cloruro de potasio a 5,4 mM, fosfato dibásico de

sodio a 0,26 mM, fosfato monobásico de potasio a 0,44 mM, bicarbonato de sodio a 4,2 mM, sal de sodio de HEPES a 10 mM, cloruro de calcio dihidratado a 8,3 mM, sulfato de magnesio heptahidratado a 0,2 mM y cloruro de magnesio hexahidratado a 0,25 mM. Esta solución se ajusta a pH 7,35 con HCl/NaOH a 2 M antes de su uso). Los especímenes se enjuagan en el tampón fisiológico durante 30 minutos.

5 Después de este enjuague, se decanta el tampón fisiológico y se reemplaza por 200 ml del tampón fisiológico de Hanks/HEPES. A este se le añaden endonucleasas, preferiblemente ADNasa y ARNasa, en cantidades preferidas de 1330 μ l de la solución concentrada de desoxirribonucleasa (tipo II de páncreas bovino, solución de NaCl/glicerol a 13,3 U/ μ l, pH 7,3) y 1330 μ l de la solución concentrada de ribonucleasa (tipo III-A de páncreas bovino, 85 μ g/ml). A
10 continuación, el tejido se coloca en un baño María con agitación, y se mezcla con suavidad (45-60 rpm) a 37 °C durante 5 horas. Al cabo de 5 horas, se decanta la solución y se reemplaza por el tampón fisiológico de Hanks/HEPES recién preparado, y se enjuaga brevemente el tejido. Esta etapa del procedimiento está diseñada para degradar el ADN y el ARN para facilitar su retirada posterior.

15 Se decanta el enjuague anterior con el tampón fisiológico y se reemplaza por 300 ml de una solución tamponada con Tris a 50 mM ajustada a pH 9 y que contiene fosfato de tri-n-butilo (TnBP) al 1% (v/v). A continuación, se le añaden al recipiente 1,5 ml de una solución a 100 \times de antibiótico/antimicótico de penicilina/estreptomicina (concentración madre de 10 000 U/ml / 10 000 mg/ml). Esta etapa del tratamiento de descelularización también se puede llevar a cabo con una solución hecha de TnBP al 1% (v/v) en etanol al 70% sin antibióticos/antimicóticos. El tejido se mezcla a
20 continuación con suavidad en una bandeja de agitación (45-60 rpm) a T = 20-25 °C durante 48 horas con cambios con la solución recién preparada cada 12 horas. Esta etapa está diseñada para retirar adicionalmente cualquier componente celular remanente (proteínas del citoesqueleto, ADN, ARN), ya que el TnBP es un disolvente caótopo de «tipo tensioactivo». Además, el TnBP se ha demostrado que desactiva los virus.

25 Después del tratamiento, se decanta la solución y se refresca con 300 ml de la solución tamponada con Tris a 50 mM ajustada a pH 9 (que no contiene TnBP). Se le añade la misma cantidad utilizada de la solución anterior de antibiótico/antimicótico (penicilina/estreptomicina) y el recipiente se deja mezclar con suavidad en una bandeja de agitación (a 40-65 rpm), T = 20-25 °C, durante 24 horas con cambio con la solución recién preparada a las 12 horas.

30 A continuación, se decanta la solución anterior del tampón de Tris a pH 9 y se reemplaza por 300 ml de una solución de ácido peracético (PAA) al 1% (v/v) en etanol (la solución de PAA consistía en ácido peracético al 2%, etanol al 100% y agua estéril (relación v/v/v 2/1/1), lo que devuelve una solución de esterilización final de PAA al 1%) durante 4 horas, se mezcla con suavidad en una bandeja de agitación (a 40-65 rpm), a T = 20-40 °C. Después del tratamiento con PAA, solución salina tamponada con fosfato estéril y recién preparada (PBS, que contiene cloruro de sodio al 0,14 M, cloruro de potasio a 2,7 mM, fosfato dibásico de sodio a 6,5 mM, fosfato monobásico de potasio a 1,5 mM y se ajusta a pH 7,4). Se le añade la misma cantidad de la solución de antibiótico/antimicótico (penicilina/estreptomicina) utilizada
35 anteriormente y el recipiente se deja mezclar con suavidad sobre una bandeja de agitación (a 40-65 rpm), T = 20-25 °C durante 12 horas. Después, se enjuaga el espécimen dos veces de 30 minutos cada una con 300 ml de solución salina tamponada con fosfato estéril y recién preparada a temperatura ambiente que no contiene ningún antibiótico/antimicótico.

40 En una etapa final, cada trozo de tejido se embotella en condiciones estériles con una relación mínima de volumen de solución por tejido de 20:1 a 50:1 en (i) solución salina tamponada con fosfato estéril infundida con solución de penicilina/estreptomicina (6 ml/l de la solución a 100 \times con una concentración madre de 10 000 U/ml / 10 000 mg/ml), o bien (ii) etanol al 70%, y se conserva a 4 °C.

45 Estos procedimientos producen una aponeurosis de humano descelularizada y esterilizada. Los análisis similares a los empleados en los ejemplos de más arriba y/o conocidos en la técnica revelan que los núcleos celulares, la principales proteínas celulares inmunógenas (p. ej., HLA-DR y HLA-A,B,C) y el contenido de ADN se reducen sustancialmente en comparación con los controles. Además, se consiguen reducciones significativas de las proteínas del citoesqueleto, tales como, p. ej., vimentina y actina β , en comparación con los controles. El análisis de la
50 termoestabilidad del colágeno revela que los métodos de descelularización protegen la mayor parte de la estructura nativa del colágeno dentro de la aponeurosis. La descelularización mediante, p. ej., los protocolos de descelularización acuosa y con etanol, también reduce la cantidad de bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* (estrept. de grupo A), *Enterococcus* sp y *Bacillus subtilis*). La retirada de las cuatro especies bacterianas se obtiene mediante la inclusión de un enjuague con ácido peracético al 1% (v/v). El injerto de la aponeurosis resultante es aceptable para el trasplante de acuerdo con las directrices dadas a conocer por los estándares de la Asociación Estadounidense de Bancos de Tejidos (AATB) [AATB (2006); (2008)].

Ejemplo 4: Descelularización y esterilización de partes blandas

55 Se recoge tejido (p. ej., una parte blanda de humano) y se prepara para el tratamiento. El grado de preparación del tejido depende del tejido a tratar, pero normalmente implica la retirada de los elementos ajenos al tejido y el corte del tejido a un tamaño que facilita la descelularización. A continuación, los especímenes se sumergen en una solución salina hipotónica (<300 mol/l), pH = 7-9, con agentes antiproteolíticos cuya concentración depende del inhibidor utilizado (fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF), aprotinina, leupeptina, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)),

- 5 antimicrobianos (penicilina, vancomicina, estreptomocina, gentamicina, kanamicina, neomicina, azida de sodio (NaN₃)), con o sin antifúngicos (amfotericina B, nistatina), preparada con agua desionizada de calidad para cultivo celular de tipo II como mínimo. El tejido se trata con una relación mínima de volumen de solución por tejido de 20:1 a 50:1, sobre una bandeja de agitación por rotación a 40-65 rpm, durante 24-48 horas, T = 4-40 °C, con cambios de solución que se producen como mínimo en intervalos de 12 horas.
- 10 A continuación el tejido se transfiere a una solución tamponada (pH = 8-10) de gran salinidad (>1 M, NaCl, KCl) que contiene del 0,2 al 3% (v/v) de un detergente aniónico, no iónico, zwitteriónico o catiónico (Triton X-100, Triton X-200, Tween 20, Tween 80, desoxicolato de sodio, CHAPS, dodecilsulfato de sodio (SDS), sarcosinato de *N*-lauroílo, Igepal CA630, sulfobetaina 10 y 16) e inhibidores de proteasas (candidatos que se recogen más arriba) preparados con agua desionizada de calidad para cultivo celular de tipo II como mínimo. El tejido se trata con una relación mínima de volumen de solución por tejido de 20:1 a 50:1, sobre una bandeja de agitación por rotación a 40-65 rpm, durante 24-48 horas, T = 4-40 °C, con cambios de solución que se producen como mínimo a intervalos de 12 horas.
- 15 El tejido se somete después a enjuagues con el tampón fisiológico estéril (solución salina equilibrada de Hanks (HBSS), HEPES, solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina tamponada con Tris (TBS)), pH = 6-8, T = 4-40 °C, 5 minutos a 1 hora, y a continuación se trata con una solución de endonucleasas (ADNasa, ARNasa, benzonasa) preparada en un tampón fisiológico (solución salina equilibrada de Hanks (HBSS), HEPES, solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina tamponada con Tris (TBS)), pH = 6-8, durante 1 a 5 horas, T = 20-40 °C. Más tarde, el tejido se enjuaga en tampón fisiológico estéril solo, tal y como se especificó más arriba, durante 5 minutos a 1 hora, T = 4-40 °C.
- 20 En la siguiente etapa, el tejido se trata con una solución estéril del 0,2 al 3% (v/v) de detergente aniónico, no iónico, zwitteriónico o catiónico (Triton X-100, Triton X-200, Tween 20, Tween 80, desoxicolato de sodio, CHAPS, dodecilsulfato de sodio (SDS), sarcosinato de *N*-lauroílo, Igepal CA630, sulfobetaina 10 y 16) o caótropro (fosfato de tri-*n*-butilo (TnBP)) preparado en (i) solución tamponada fisiológica (solución salina equilibrada de Hanks (HBSS), HEPES, solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina tamponada con Tris (TBS)) ajustada a pH = 7-9 con antimicrobianos (penicilina, vancomicina, estreptomocina, gentamicina, kanamicina, neomicina, azida de sodio (NaN₃)), con o sin antifúngicos (amfotericina B, nistatina), o bien con (ii) etanol al 50-70%, durante 24 a 48 horas a T = 4-40 °C. Después, el tejido se enjuagó con una solución estéril tamponada con Tris a 50 mM ajustada a pH 9 (que no contiene detergente ni caótropro) durante 12 a 24 horas a T = 4-40 °C.
- 25
- 30 A continuación, el tejido se trata con una solución de ácido peracético (PAA) al 0,05-3% (v/v) en etanol o solución salina tamponada con fosfato (PBS) neutralizada a pH = 7 a 7,5, durante un periodo de 30 minutos a 4 horas a T = 20-40 °C. El tejido se enjuaga luego con tampón fisiológico estéril (solución salina equilibrada de Hanks (HBSS), HEPES, solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina tamponada con Tris (TBS)) con antimicrobianos (penicilina, vancomicina, estreptomocina, gentamicina, kanamicina, neomicina, azida de sodio (NaN₃)), con o sin antifúngicos (amfotericina B, nistatina), durante 12 a 24 horas a T = 4-40 °C.
- 35 Finalmente, los tejidos se embotellan en condiciones estériles en (i) tampón fisiológico estéril (solución salina equilibrada de Hanks (HBSS), HEPES, solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina tamponada con Tris (TBS)) con antimicrobianos (penicilina, vancomicina, estreptomocina, gentamicina, kanamicina, neomicina, azida de sodio (NaN₃)), con o sin antifúngicos (amfotericina B, nistatina), o bien (ii) etanol al 50-70%, y se conservan a T = 4-25 °C.
- 40 Estos procedimientos producen el tejido descelularizado y esterilizado. Los análisis similares a los empleados en los ejemplos de más arriba y/o conocidos en la técnica revelan que los núcleos celulares, las principales proteínas inmunógenas de la célula (p. ej., HLA-DR y HLA-A,B,C) y el contenido de ADN están sustancialmente reducidos en comparación a los controles. Además, se consiguen reducciones significativas de las proteínas del citoesqueleto, tales como, p. ej., vimentina y actina β, en comparación con los controles. El análisis de termoestabilidad del colágeno revela que los métodos de descelularización protegen la mayor parte de la estructura nativa del colágeno dentro del tejido. La descelularización mediante, p. ej., los protocolos de descelularización acuosa o con etanol, también reduce la cantidad de bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* (estrept. de grupo A), *Enterococcus* sp., y *Bacillus subtilis*). La retirada de las cuatro especies de bacterias se obtiene mediante la inclusión de un enjuague con ácido peracético al 1% (v/v). El injerto resultante es aceptable para el trasplante de acuerdo con las directrices dadas a conocer en los estándares de la Asociación Estadounidense de Bancos de Tejidos (AATB) [AATB (2006); (2008)].
- 45
- 50

Tablas

Tabla 1. Resultados del ensayo de ADN que indican la retirada del ADN celular de las muestras de piel de humano por debajo de los niveles de detección (0,5 ng/mg de peso seco del tejido) después del tratamiento de descelularización	
Muestra	Contenido de ADN en ng/mg (peso seco) de tejido
Piel de humano en fresco	650 ± 131
Método de descelularización acuosa	No se detecta**
Método de descelularización con etanol	No se detecta**

**No se detecta es <0,25 ng/ml o <0,5 ng/mg (ppm) de peso seco, el estándar más bajo detectado mediante el ensayo de ADN PicoGreen® (Invitrogen™ Molecular Probes®) cuando se usa una muestra de 10 mg de peso seco.

Tabla 2. Resultados de la prueba de tensión hidrotérmica isométrica (THI)			
Donante	Inflexión de la THI (°C) o temperatura de desnaturalización		
	En fresco	Acuosa	Con etanol al 70%
TD09-163	67,5	68	66
TD09-195	66,5	66,5	66
TD09-196	67	67,5	64,5
TD09-242	67	66,5	66,5
Promedio ± DE	67,0 ± 0,4	67,1 ± 0,8	65,8 ± 0,9

La prueba de la THI es una medida de la estabilidad del colágeno dentro de las partes blandas. Si nuestro procedimiento había alterado la estructura del colágeno (el principal componente en la dermis humana), entonces veríamos una caída significativa de la temperatura de desnaturalización de la piel de humano descelularizada. Los datos que se muestran más arriba de 4 donantes diferentes indican que no hay ningún cambio en la estabilidad del colágeno ni, por lo tanto, en la estructura del colágeno después del tratamiento de descelularización.

Tabla 3 (a)

5 Donante TD10-238

Microorganismo	Concentración de la solución de lavado						Piel	Siembra directa
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸		
<i>S. aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterococcus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
Control negativo	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 3 (b)

Donante TD10-272

Microorganismo	Concentración de la solución de lavado						Piel	Siembra directa
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸		
<i>S. aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterococcus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
Control negativo	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 3 (c)

5 Donante TD09-195

Microorganismo	Concentración de la solución de lavado						Piel	Siembra directa
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸		
<i>S. aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterococcus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
Control negativo	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 3 (d)

Donante TD10-240

Microorganismo	Concentración de la solución de lavado						Piel	Siembra directa
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸		
<i>S. aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterococcus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
Control negativo	0	0	0	0	0	0	0	0

10 Tabla 3 a-d. Resultados del ensayo microbiológico de biocarga después de 7 días de incubación. Las muestras de piel de humano en fresco de 4 donantes —(a) TD10-238, (b) TD10-272, (c) TD09-195, (d) TD10-240— se inocularon con 400 µl de la solución que contiene 10⁸ UFC/ml de *S. aureus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* o *Bacillus*. Las muestras de piel en fresco se descelularizaron a continuación con el uso del procedimiento esbozado en la figura 1. Después de la descelularización, las muestras se lavaron con 10 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril y diluciones en serie (de 10⁻³ a 10⁻⁸) del lavado con PBS se sembraron en puntos sobre placas de agar de soja tríptica (placas de TSA). La piel lavada con PBS (etiquetada como «piel») y una muestra de piel descelularizada sin lavar con PBS (etiquetada como «siembra directa») también se sembraron directamente sobre placas de TSA. Todas las placas de TSA se incubaron durante 7 días. No se detectaron colonias de bacterias en las soluciones de PBS utilizadas para enjuagar la piel descelularizada o mediante la siembra directa en placas de la piel descelularizada. Los controles negativos consistían en placas de TSA sin nada.

15

20

Tabla 4 (a)

Donante TD10-238

Microorganismo	Concentración de la solución de lavado						Piel
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	
<i>S. aureus</i>	DpeR	DpeR	DpeR	52	9	0	DpeR
<i>Streptococcus</i>	DpeR	DpeR	DpeR	127	12	1	DpeR
<i>Enterococcus</i>	DpeR	DpeR	DpeR	72	7	1	DpeR
<i>Bacillus</i>	DpeR	DpeR	DpeR	24	2	1	DpeR

Tabla 4 (b)

Donante TD10-272

Microorganismo	Concentración de la solución de lavado						Piel
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	
<i>S. aureus</i>	DpeR	DpeR	DpeR	80	11	0	DpeR
<i>Streptococcus</i>	DpeR	DpeR	DpeR	103	12	1	DpeR
<i>Enterococcus</i>	DpeR	DpeR	DpeR	61	7	1	DpeR
<i>Bacillus</i>	DpeR	DpeR	DpeR	33	2	0	DpeR

Tabla 4 (c)

5 Donante TD09-195

Microorganismo	Concentración de la solución de lavado						Piel
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	
<i>S. aureus</i>	DpeR	DpeR	DpeR	59	8	1	DpeR
<i>Streptococcus</i>	DpeR	DpeR	DpeR	90	6	0	DpeR
<i>Enterococcus</i>	DpeR	DpeR	DpeR	71	8	1	DpeR
<i>Bacillus</i>	DpeR	DpeR	DpeR	23	1	0	DpeR

Tabla 4 (d)

Donante TD10-240

Microorganismo	Concentración de la solución de lavado						Piel
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	
<i>S. aureus</i>	DpeR	DpeR	DpeR	57	6	0	DpeR
<i>Streptococcus</i>	DpeR	DpeR	DpeR	88	4	0	DpeR
<i>Enterococcus</i>	DpeR	DpeR	DpeR	88	4	0	DpeR
<i>Bacillus</i>	DpeR	DpeR	DpeR	30	3	1	DpeR

10 Tabla 4 a-d. Resultados del ensayo microbiológico para los controles positivos de inoculación. Las muestras de piel de humano en fresco de 4 donantes —(a) TD10-238, (b) TD10-272, (c) TD09-195, (d) TD10-240— se inocularon cada una con 400 µl de la solución que contiene 10⁸ UFC/ml de *S. aureus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* o *Bacillus*. Las muestras se lavaron con 10 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril y diluciones en serie (de 10⁻³ a 10⁻⁸) del lavado con PBS se sembraron en puntos sobre placas de agar de soja tríptica (placas de TSA). La piel lavada con PBS (etiquetada como «piel») también se sembró directamente sobre placas de TSA. Todas las placas de TSA se incubaron durante 24 h y se les determinó el número de colonias. Todas las muestras mostraban un crecimiento bacteriano positivo, lo que indica que las bacterias inoculadas crecerán en el tejido descelularizado. Nota: DpeR = Demasiadas para el Recuento.

15

Tabla 5					
Donante	Microorganismo				
	<i>S. aureus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Bacillus</i>	Hongo
TD10-238	No crece	No crece	No crece	No crece	Sin hongos
TD10-195	No crece	No crece	No crece	No crece	Sin hongos
TD10-272	No crece	No crece	No crece	No crece	Sin hongos

5 Tabla 5. Resultados del análisis realizado por terceros con respecto a la retirada de la biocarga. Las muestras de piel en fresco (2 cm × 2,5 cm) de 3 donantes diferentes se inocularon cada una con 400 µl de la solución que contiene 10⁸ UFC/ml de *S. aureus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* o *Bacillus*. Las muestras de piel en fresco se desculturaron entonces con el uso del procedimiento esbozado en la figura 1. Después de la desculturación, las muestras se enviaron al Departamento de Anatomía Patológica y Medicina de Laboratorio, Autoridad Sanitaria del Distrito de la Capital, Halifax, Nueva Escocia, Canadá, para el análisis de acuerdo con los estándares de la Asociación Estadounidense de Bancos de Tejidos (AATB) (12.^a edición). En ninguna muestra se detectaron bacterias ni hongos.

Referencias

- 10 Lee J. M., Pereira C. A., Abdulla D., Naimark W. A. y Crawford I. (1995) A multi-sample denaturation temperature tester for collagenous biomaterials. *Med Eng Phys* 17: 115-121
- (AATB) American Association of Tissue Banks (2008), Standards for Tissue Banking. 12.^a edición. McLean (VA)
- (AATB) American Association of Tissue Banks (2006), Guidance Document: Current Good Tissue Practice: Núm.3, 27 de junio de 2006
- 15 Pianigiani, E., Ierardi, F., Cuciti, C., Brignali, S., Oggioni, M. y Fimiani, M. (2009). Processing efficacy in relation to microbial contamination of skin allograft from 723 donors. *Burns*, 36(3), 347-351.
- Stewart, C. P., Dunne, A., Skies, A. y Hoover, D. G. (2000). Sensitivity of spores of *Bacillus subtilis* and *Clostridium sporogenes* PA3679 to combinations of high hydrostatic pressure and other processing parameters. *Innovative Food Science Emergency Technology*, 1, 49-56.
- 20 ISO 11737-1 "Sterilization of medical devices-Microbiological methods. Parte 1: Determination of a population of microorganisms on products", 2.^a edición, 1 de abril de 2006.
- ISO 11737-2 "Sterilization of medical devices-Microbiological methods. Parte 1: Tests of sterility performed in the definition, validation and maintenance of a sterilization process", 2.^a edición, 15 de noviembre de 2009.
- 25 MacLean, S. B. A y Gratzner, P. F. (2011) "Effect of basic fibroblast growth factor (bFGF) on the cellular repopulation of decellularized ACL allografts" *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 5:201-209
- P. F. Gratzner, R. D. Harrison y T. Woods (2006) "Disruption of the Extracellular Matrix by SDS and Not Residual Toxicity Prevents Cellular Infiltration of Acellularized Tissues" *Tissue Engineering* 12(10): 2975-2983
- T. Woods y P. F. Gratzner (2005) "Effectiveness of Three Extraction Techniques in the Development of an Acellular Bone-Anterior Cruciate Ligament (ACL)-Bone Graft" *Biomaterials* 26: 7339-49
- 30 R. D. Harrison y P. F. Gratzner (2005) "Cellular Repopulation of a Naturally Derived Extracellular Matrix Scaffold for Anterior Cruciate Ligament Replacement" *Journal of Biomedical Materials Research*, 75A: 841-54
- S. B. A. MacLean y P. F. Gratzner (2006) "Comparison of Seeding Methods Used in the Repopulation of Decellularized Porcine Anterior Cruciate Ligament Tissue", *Proceedings of the 25th Canadian Biomaterials Society*, 26-28 de mayo, Universidad de Calgary, Calgary, Alberta
- 35 S. B. A. MacLean y P. F. Gratzner (2006) "Repopulation of decellularized porcine anterior cruciate ligaments with porcine ACL fibroblasts: A study into the effects of seeding methodology and the use of basic fibroblast growth factor (bFGF)", *Regenerate: World Congress on Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 25-27 de abril, Pittsburgh, PA, USA
- 40 S. B. A. MacLean y P. F. Gratzner (2005) "The *In vitro* Application of Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) for Repopulation of the Decellularized Porcine Anterior Cruciate Ligament (ACL)", *55th Canadian Chemical Engineering Conference*, 16-19 de octubre, Toronto, Ontario

C. R. Dyck y P. F. Gratzner (2005) "Validation of a Decellularized B-ACL-B rat Model for ACL Allograft Regeneration Studies", *55th Canadian Chemical Engineering Conference*, 16-19 de octubre, Toronto, Ontario

C. R. Dyck y P. F. Gratzner (2006) "Use of Bone Marrow Stromal Cells to Repopulate Decellularized Anterior Cruciate Ligaments", *Proceedings of the 25th Canadian Biomaterials Society*, 26-28 de mayo, Universidad de Calgary, Calgary, Alberta

5

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un tejido bioprotésico para humano, que comprende:
poner en contacto un tejido de humano con una solución hipotónica para producir un tejido lisado;
- 5 poner en contacto el tejido lisado con una primera solución de tensioactivo para producir un tejido tratado con tensioactivo;
poner en contacto el tejido tratado con tensioactivo con una solución enzimática de nucleasas para producir un tejido tratado con enzimas;
- 10 poner en contacto el tejido tratado con enzimas con una solución de limpieza que comprende un segundo tensioactivo, un caótropro, o una mezcla de los mismos, para producir un tejido descelularizado; y
poner en contacto el tejido descelularizado con una solución de agente reductor de biocarga para producir el tejido bioprotésico para humano,
en donde la solución de agente reductor de biocarga comprende ácido peracético al 1% (v/v).
- 15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tejido de humano es tejido de piel de humano, en donde la solución hipotónica comprende tampón de Tris a 10 mM, en donde la primera solución de tensioactivo comprende Triton X-100® (octilfenoxipolietoxietanol) al 1% (v/v), en donde la solución enzimática de nucleasas comprende ARNasa y ADNasa, en donde la solución de limpieza comprende fosfato de tri-n-butilo (TnBP) al 1% (v/v), en donde cada etapa del método se realiza por separado con respecto a las otras etapas del método, y en donde cada etapa del método va inmediatamente seguida por una etapa de enjuague antes de comenzar la siguiente etapa del método.
- 20 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además poner en contacto uno o varios de los tejidos con una solución fisiológicamente isotónica.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde una o varias de las soluciones comprende además un inhibidor de proteasas, optativamente, en donde el inhibidor de proteasas es un inhibidor de serina proteasas, un inhibidor de metaloproteasas, o una combinación de los mismos, o en donde el inhibidor de proteasas es el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), o en donde el inhibidor de proteasas es fluoruro de fenilmetanosulfonilo.
- 25 5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde una o varias de las soluciones comprende además un agente reductor de biocarga, optativamente, en donde el agente reductor de biocarga comprende penicilina, estreptomocina, ácido peracético, etanol o una combinación de los mismos.
- 30 6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la solución hipotónica comprende uno o varios tampones orgánicos o inorgánicos, uno o varios antibióticos o antimicóticos, un pH alcalino, y en donde la osmolaridad de la solución se mantiene como hipotónica para las células.
- 35 7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la primera solución de tensioactivo comprende una sal seleccionada del grupo que consiste en KCl y NaCl, uno o varios tampones orgánicos o inorgánicos, uno o varios antibióticos o antimicóticos, un pH alcalino, uno o varios inhibidores de proteasas, y del 0,2 al 3% (v/v) de un detergente aniónico, no iónico, zwitteriónico o catiónico seleccionado del grupo que consiste en Triton X-100, Triton X-200, Tween 20, Tween 80, desoxicolato de sodio, CHAPS, dodecilsulfato de sodio (SDS), sarcosinato de *N*-lauroilo, Igepal CA630, y sulfobetaína 10 y 16).
- 40 8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la primera solución de tensioactivo es una solución salina a >1 M.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la primera solución de tensioactivo comprende un tensioactivo aniónico, optativamente, en donde el tensioactivo aniónico es Triton X-100®.
- 45 10. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la solución enzimática de nucleasas comprende una endonucleasa seleccionada del grupo que consiste en ADNasa, ARNasa y benzonasa, en donde la solución se prepara con un tampón fisiológico seleccionado del grupo que consiste en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS), HEPES, solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina tamponada con Tris (TBS), y en donde la solución se mantiene a un pH de 6 a 8, o en donde la enzima de tipo nucleasa es ADNasa, ARNasa, o una combinación de las mismas.
- 50 11. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la solución de limpieza comprende del 0,2 al 3% (v/v) de un detergente aniónico, no iónico, zwitteriónico o catiónico seleccionado del grupo que consiste en Triton X-100,

Triton X-200, Tween 20, Tween 80, desoxicolato de sodio, CHAPS, dodecilsulfato de sodio (SDS), sarcosinato de *N*-lauroilo, Igepal CA630, y sulfobetaina 10 y 16, o fosfato de tri-*n*-butilo (TnBP), uno o varios tampones orgánicos o inorgánicos, uno o varios antibióticos o antimicóticos, un pH alcalino, y en donde la solución se prepara en un disolvente acuoso o con etanol al 70%, o en donde la solución de limpieza comprende además la base de TRIZMA®.

- 5 12. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además el tratamiento con ultrasonidos de uno o varios de los tejidos.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además la realización de una o varias etapas a una temperatura de entre 22 °C y 40 °C, preferiblemente en donde el contacto del tejido tratado con enzimas con la solución de limpieza se lleva a cabo a aproximadamente 22 °C.
- 10 14. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tejido de humano es un tejido de piel de humano, o en donde el tejido de humano es una parte blanda de humano, preferiblemente en donde la parte blanda de humano es una válvula cardíaca, tendón, ligamento, arteria, vena, diafragma, pericardio, aponeurosis, duramadre, tímpano, conducto aórtico o cartílago, o en donde el tejido bioprotésico para humano es dermis de humano, o en donde el tejido descelularizado está descelularizado, optativamente, en donde el tejido descelularizado está descelularizado al menos al 90%, optativamente, en donde el tejido descelularizado está descelularizado al menos al 95%.
- 15 15. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tejido descelularizado se caracteriza por una ausencia sustancial de tinción positiva para el núcleo de las células.
16. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tejido descelularizado se caracteriza por una ausencia sustancial de ADN celular.
- 20 17. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tejido descelularizado se caracteriza por una ausencia sustancial de proteínas inmunógenas, preferiblemente en donde la proteína inmunógena es HLA-DR o HLA-A,B,C.
18. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tejido bioprotésico se caracteriza por la ausencia de patógenos y esporas.
- 25 19. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tejido descelularizado se caracteriza por una reducción de más del 70-80% de la cantidad de proteínas del citoesqueleto, preferiblemente en donde las proteínas del citoesqueleto son vimentina, actina β , actina α , miosina, tubulina y vinculina.
20. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la solución de limpieza comprende además fosfato de tri-*n*-butilo (tnBP).
- 30 21. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tejido de humano es piel alógena de humano.
22. Un tejido bioprotésico, en donde el tejido está libre al 100% de ácidos nucleicos, en donde el tejido está libre al 100% de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), en donde el tejido está libre al 100% de bacterias estafilocócicas, en donde el tejido está libre al 100% de bacterias estreptocócicas, en donde el tejido está libre al 100% de bacterias enterocócicas, en donde el tejido está libre al 100% de bacterias de tipo bacilo, y en donde la estructura del colágeno del tejido no está sustancialmente alterada en comparación con un tejido de control en fresco, optativamente, en donde el tejido está libre al 100% de bacterias de tipo *Staphylococcus aureus*, en donde el tejido está libre al 100% de bacterias de tipo *Streptococcus pyogenes*, en donde el tejido está libre al 100% de bacterias de tipo *Enterococcus*, y en donde el tejido está libre al 100% de *Bacillus subtilis*.
- 35 23. El tejido bioprotésico de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el tejido es piel de humano.
- 40 24. El tejido bioprotésico de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el ácido nucleico es ADN o ARN.
25. El tejido bioprotésico de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el ácido nucleico es ADN.
26. El tejido bioprotésico de acuerdo con la reivindicación 25, en donde el tejido tiene menos de 0,5 ng de ADN por miligramo de peso seco de tejido.
- 45 27. El tejido bioprotésico de acuerdo con la reivindicación 25, en donde el tejido tiene menos de 0,5 ng de ADN por miligramo de peso seco de tejido según se mide mediante el ensayo de ADN PicoGreen®.
28. El tejido bioprotésico de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el CMH es HLA-DR, y en donde el tejido está libre de HLA-DR según se mide por inmunohistoquímica.
29. El tejido bioprotésico de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el CMH es HLA-A,B,C, y en donde el tejido está libre de HLA-A,B,C según se mide por inmunohistoquímica.

30. El tejido bioprotésico de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el tejido está libre de vimentina según se mide por inmunohistoquímica, o en donde el tejido está libre de actina β según se mide por inmunohistoquímica.
31. El tejido bioprotésico de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el tejido comprende elastina según se mide por histología con el uso de la tinción de Van Gieson.
- 5 32. El tejido bioprotésico de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el tejido comprende uno o varios proteoglicanos según se mide por histología con el uso de la tinción tricrómica de Masson.
33. El tejido bioprotésico de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el tejido está libre de hongos, o en donde la estructura del colágeno del tejido no está sustancialmente alterada en comparación con un tejido de control en fresco, según se valora por la estabilidad térmica del colágeno.
- 10 34. El tejido bioprotésico de acuerdo con la reivindicación 22, en donde la temperatura de desnaturalización del tejido no está sustancialmente alterada en comparación con un tejido de control en fresco.
35. El tejido bioprotésico de acuerdo con la reivindicación 22, en donde la temperatura de desnaturalización del tejido es de aproximadamente 64, 65, 66, 67, 68 o 69 °C, según se mide por una prueba de tensión hidrotérmica isométrica (THI).
- 15 36. Un kit, que comprende una solución hipotónica; una primera solución de tensioactivo; una solución enzimática de nucleasas; una solución de limpieza que comprende un segundo tensioactivo, o un caótopo, o una mezcla de los mismos; una solución de agente reductor de biocarga que comprende ácido peracético al 1% (v/v); e instrucciones para poner en contacto un tejido de humano con cada una de las soluciones, optativamente, en donde el kit comprende además el tejido.

20

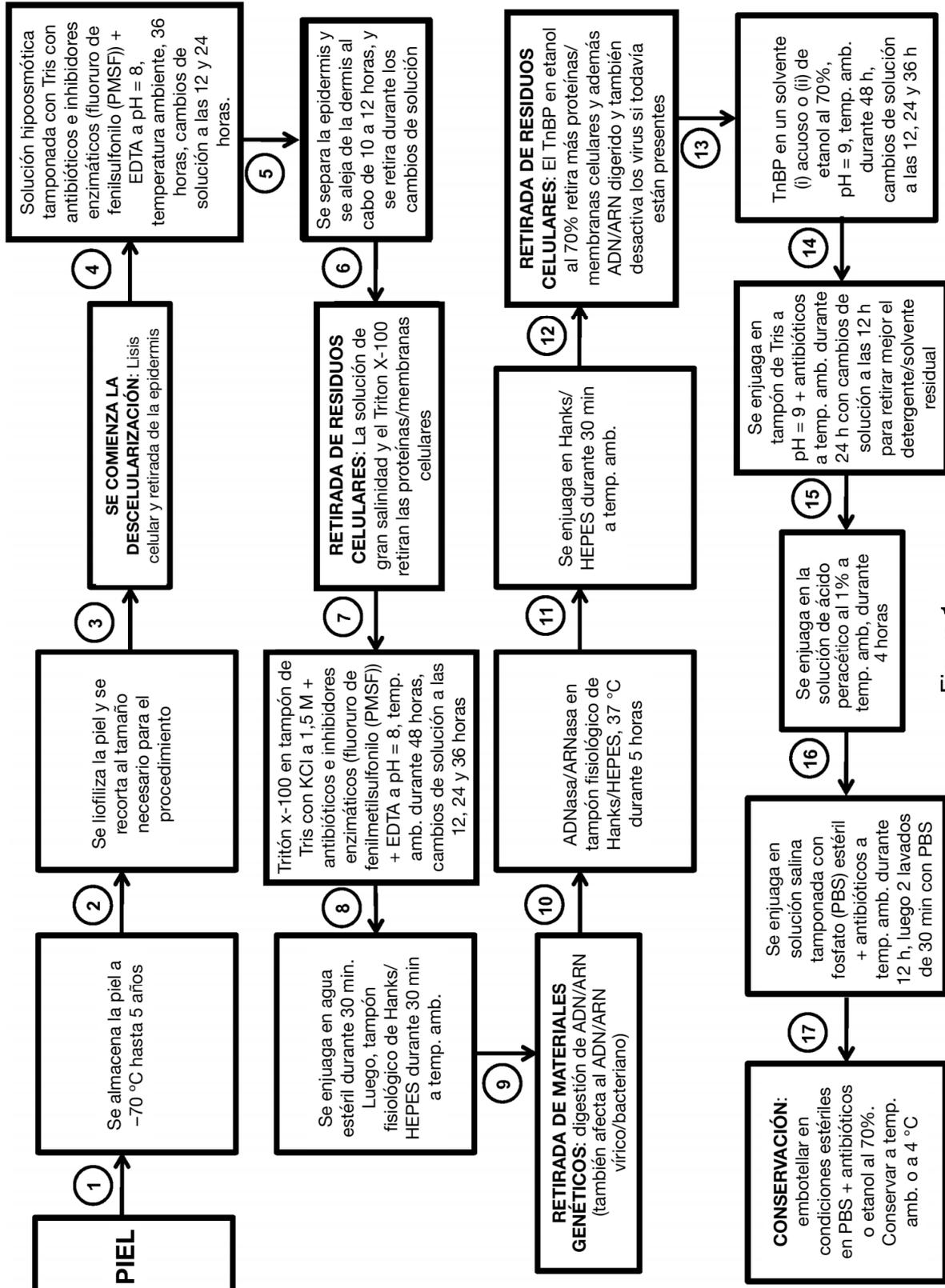


Figura 1

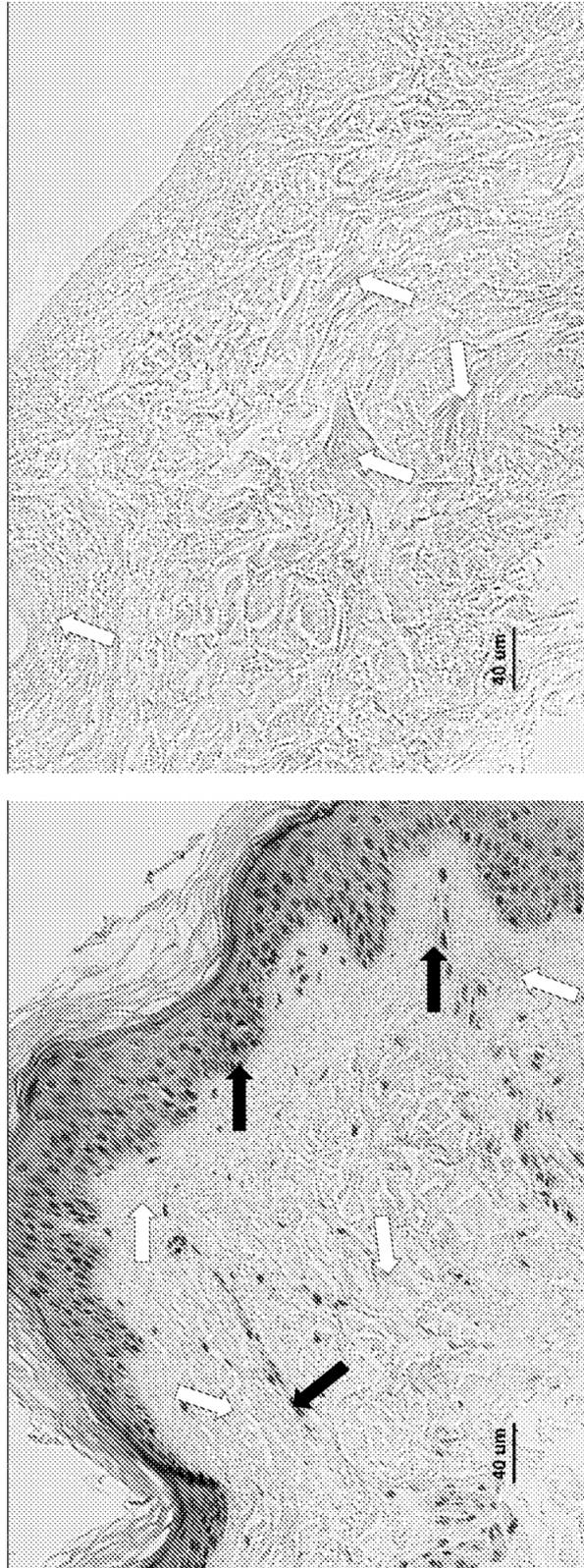


Figura 2

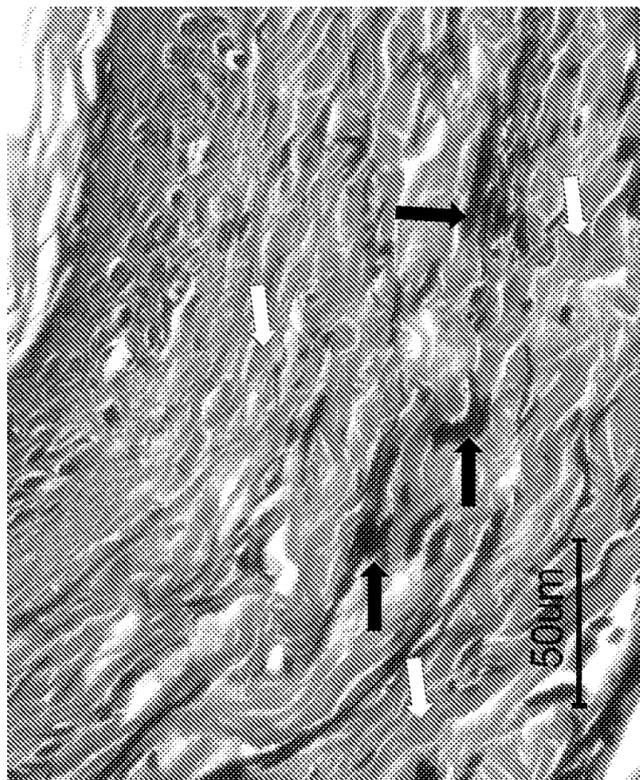
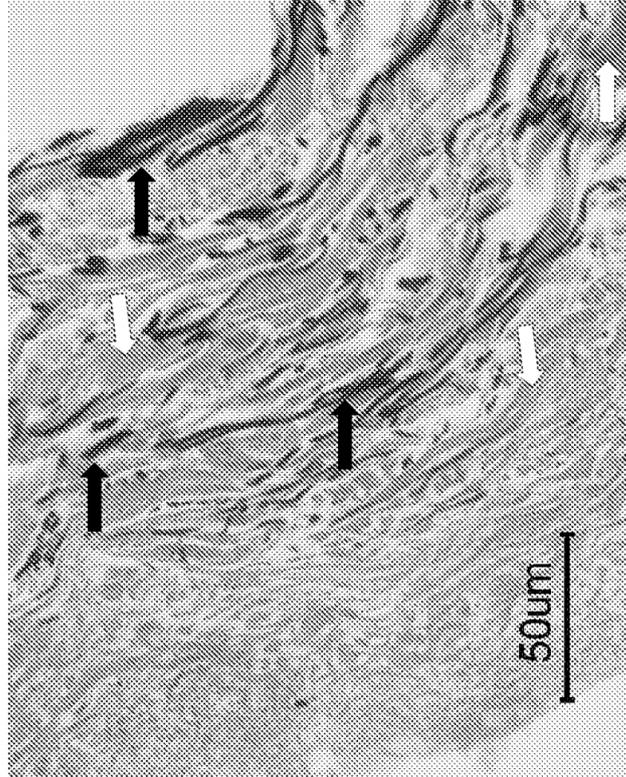


Figura 3

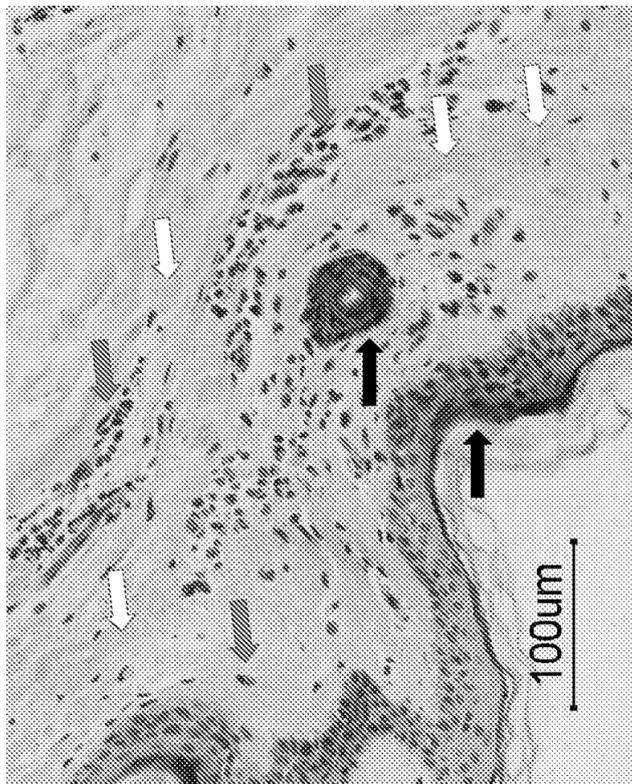
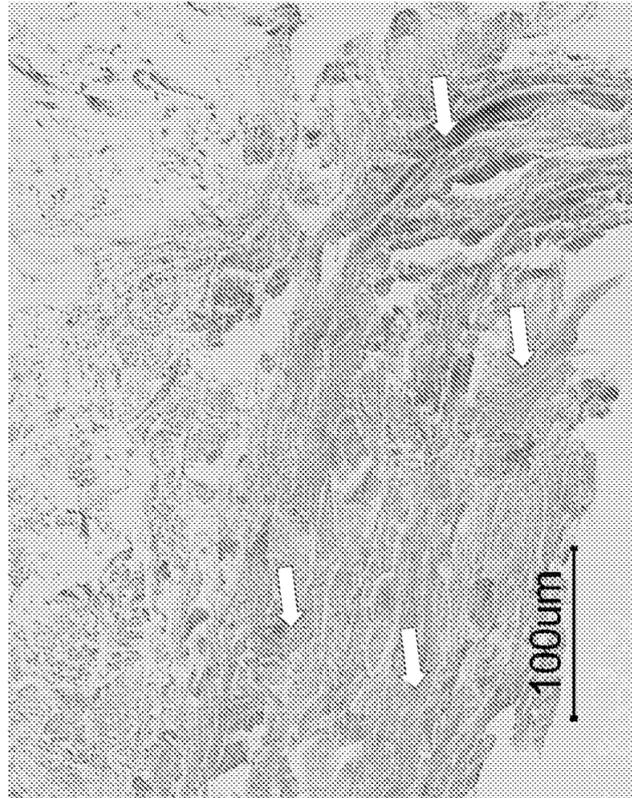


Figura 4

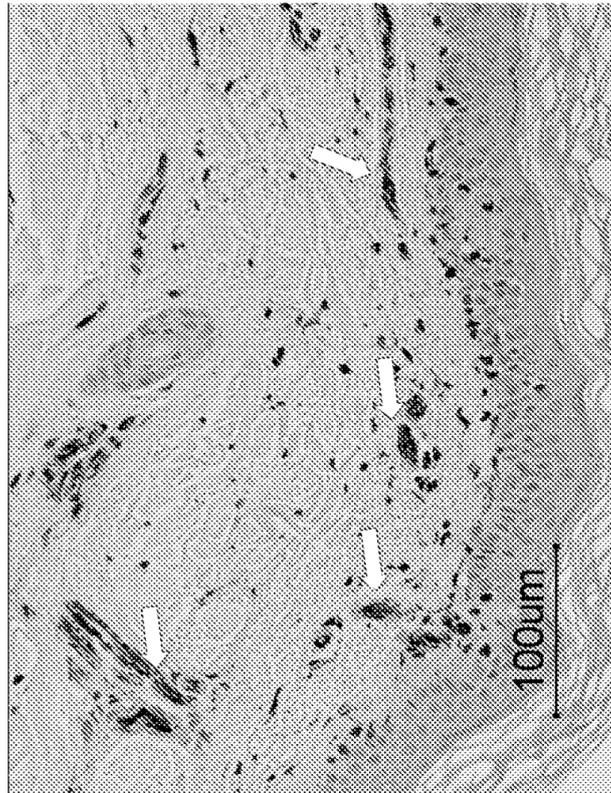
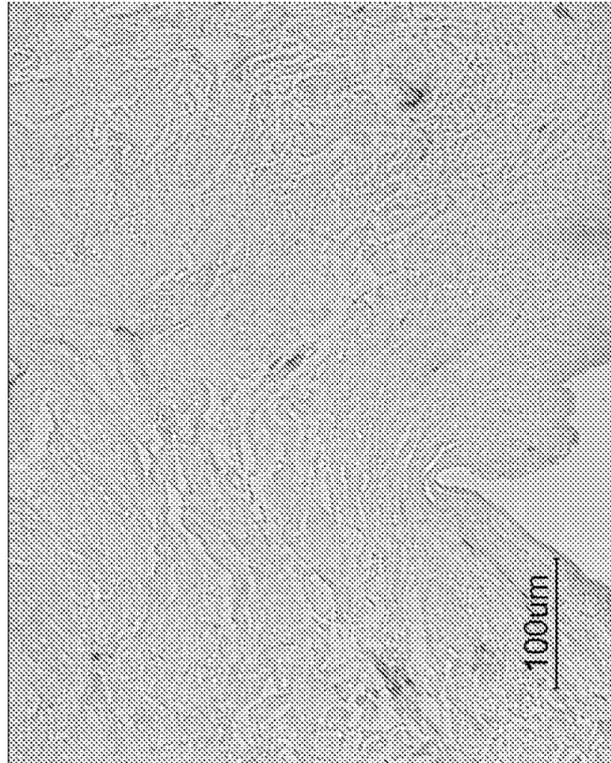


Figura 5

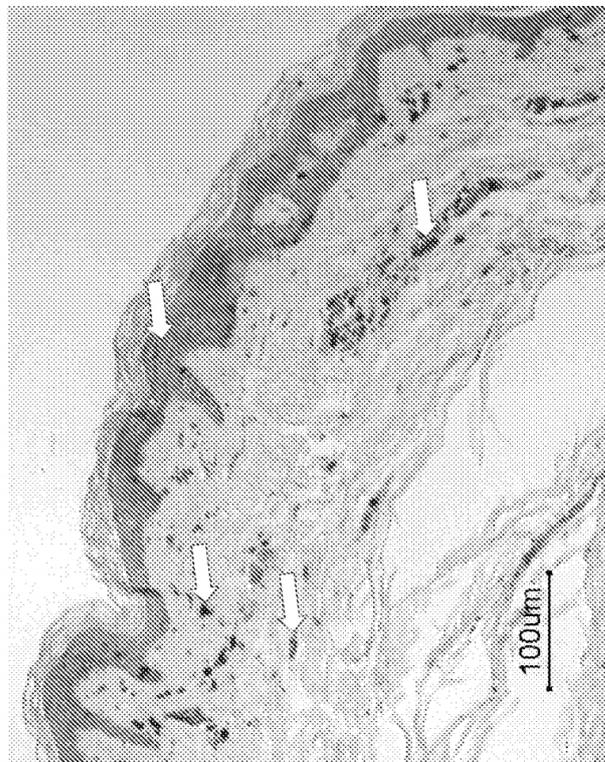
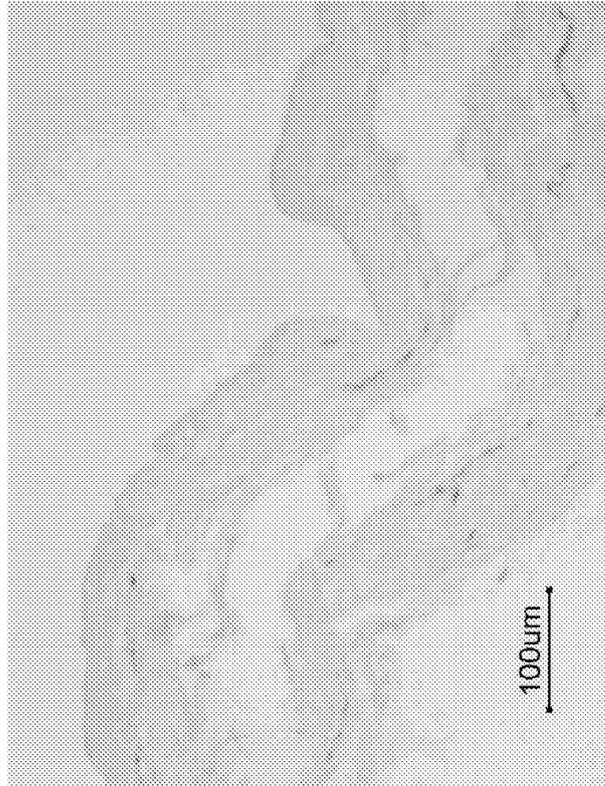


Figura 6

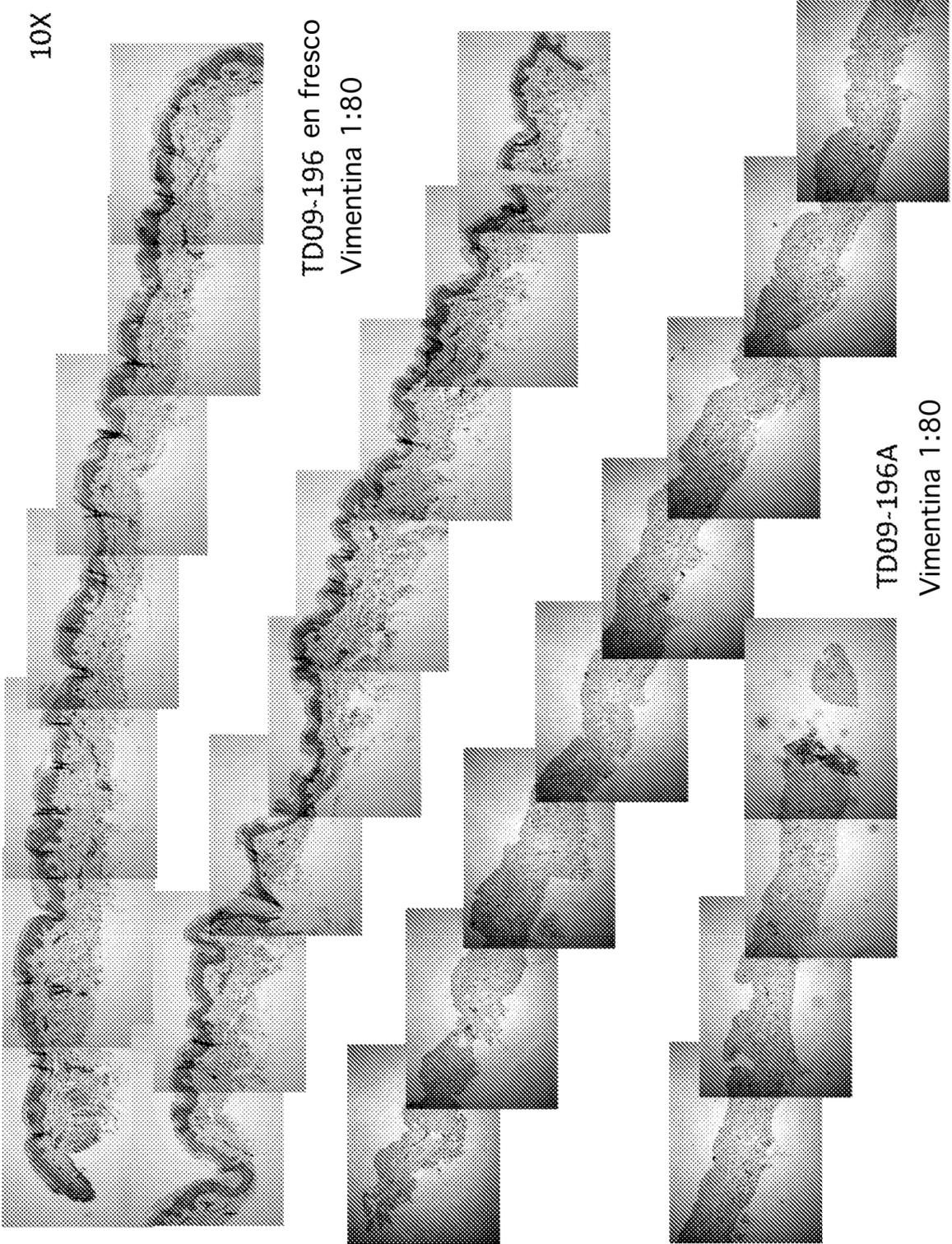


Figura 7

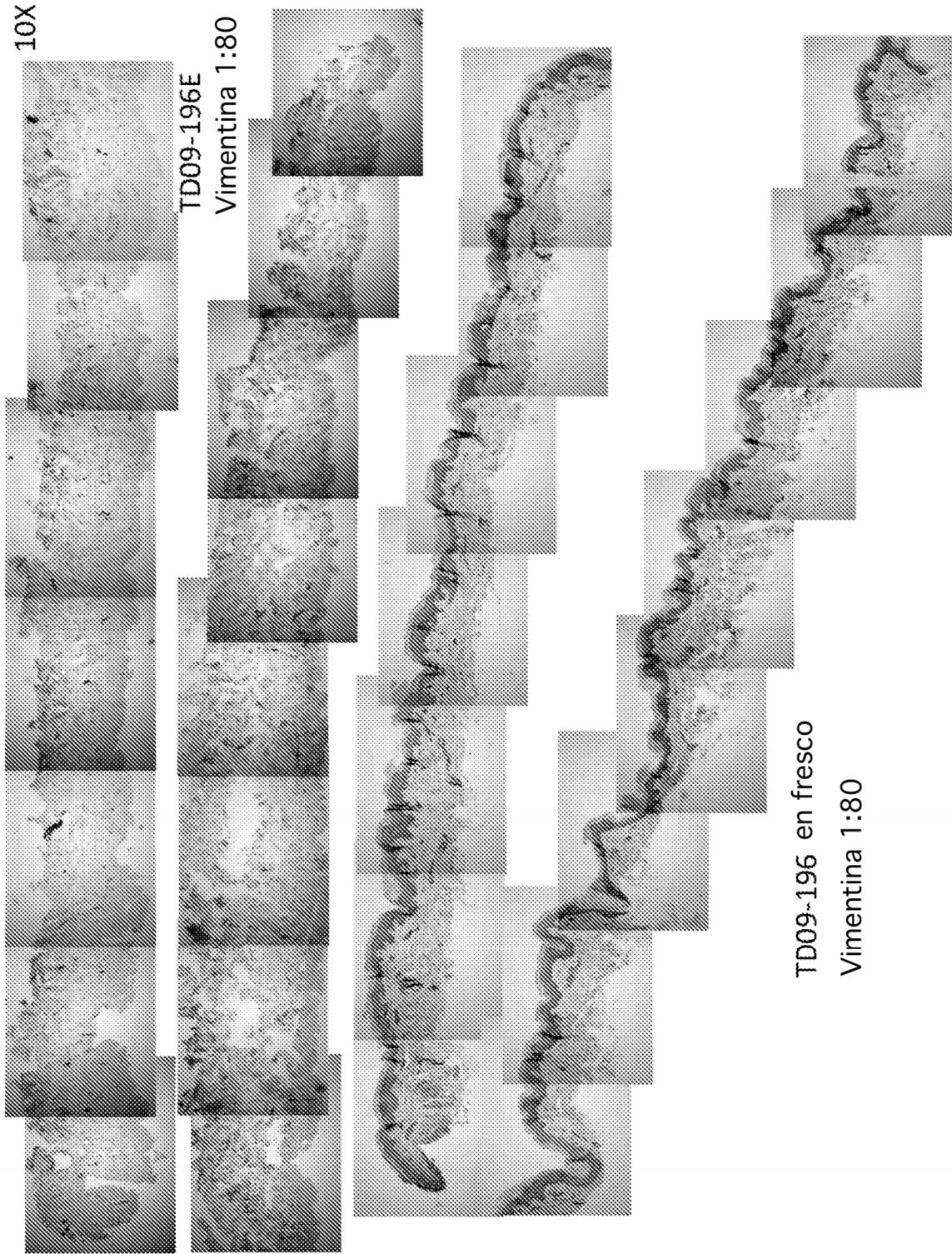


Figura 8

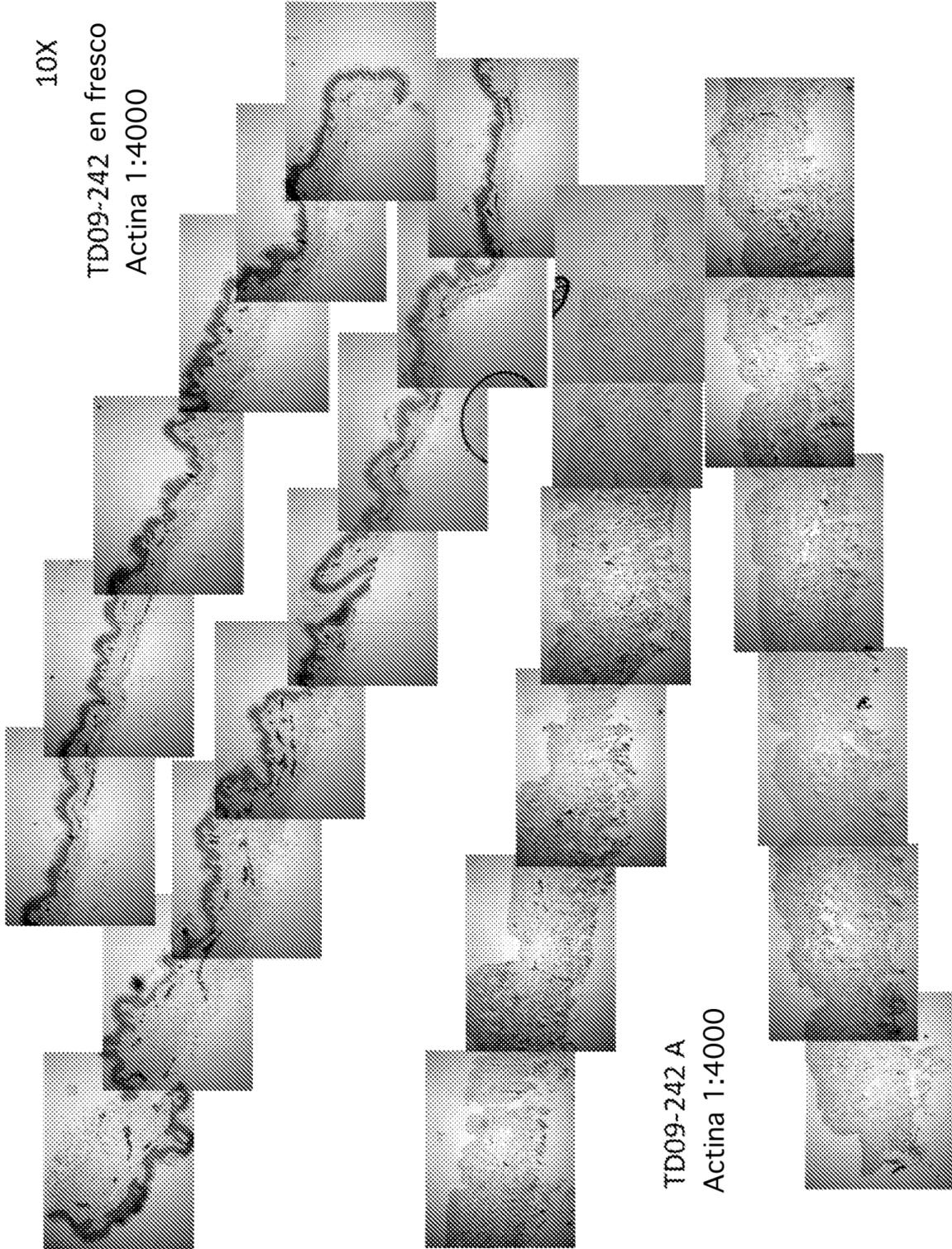


Figura 9

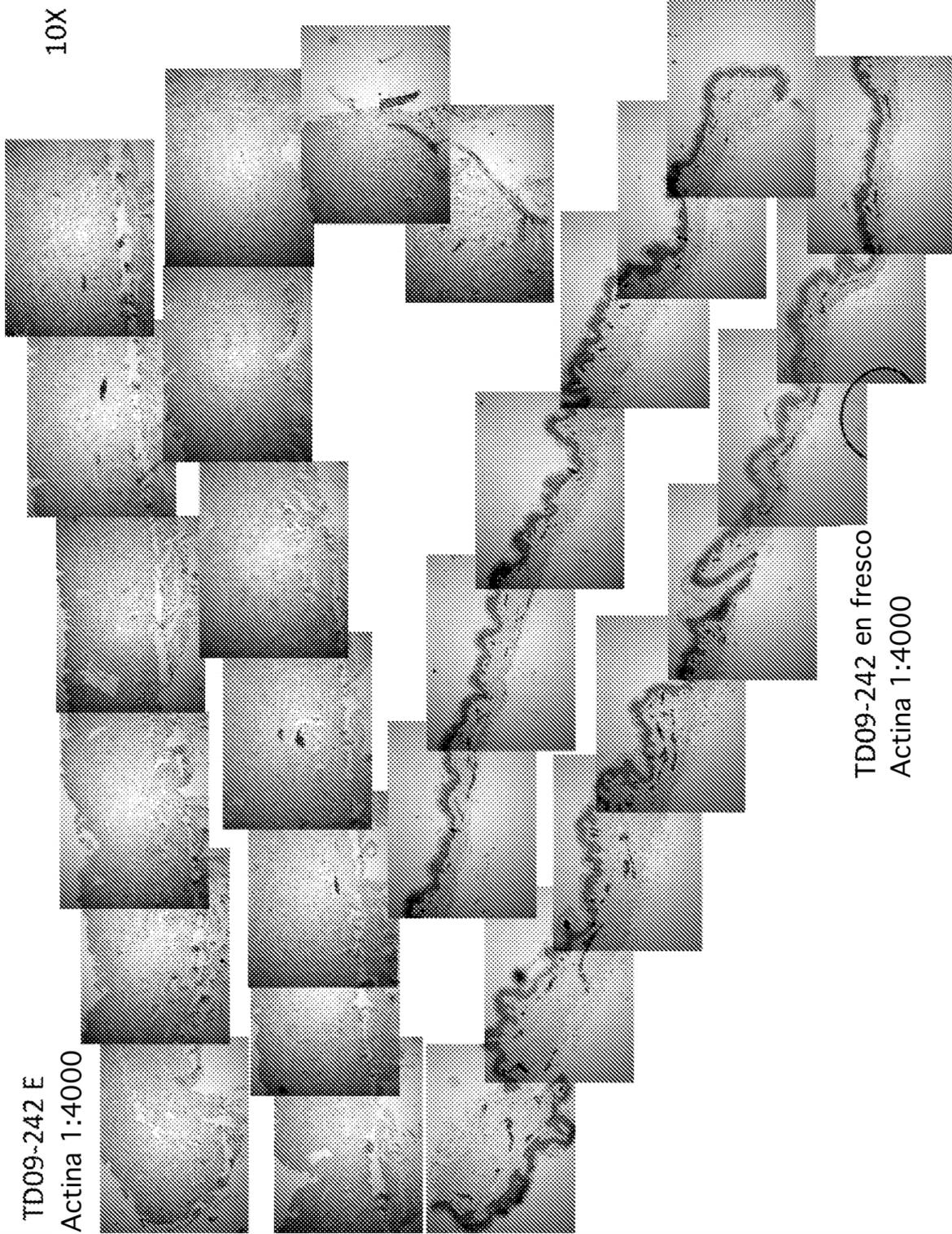


Figura 10

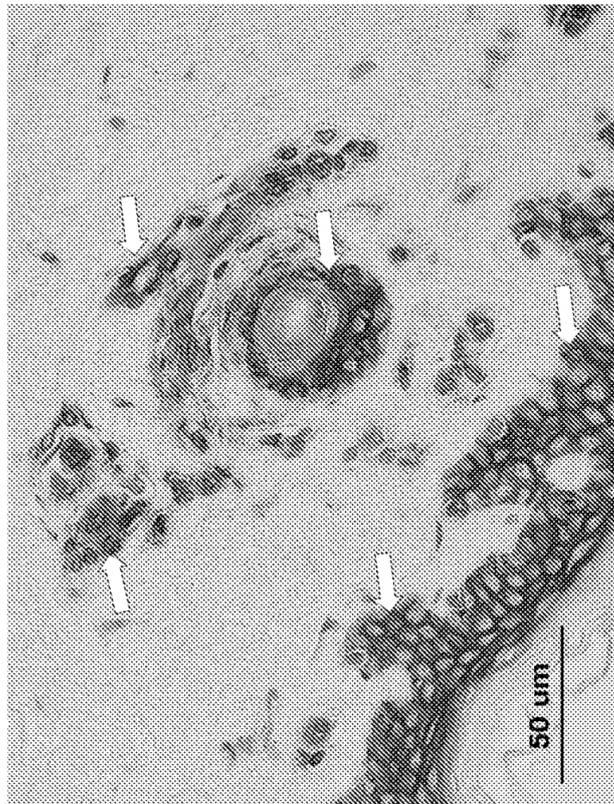
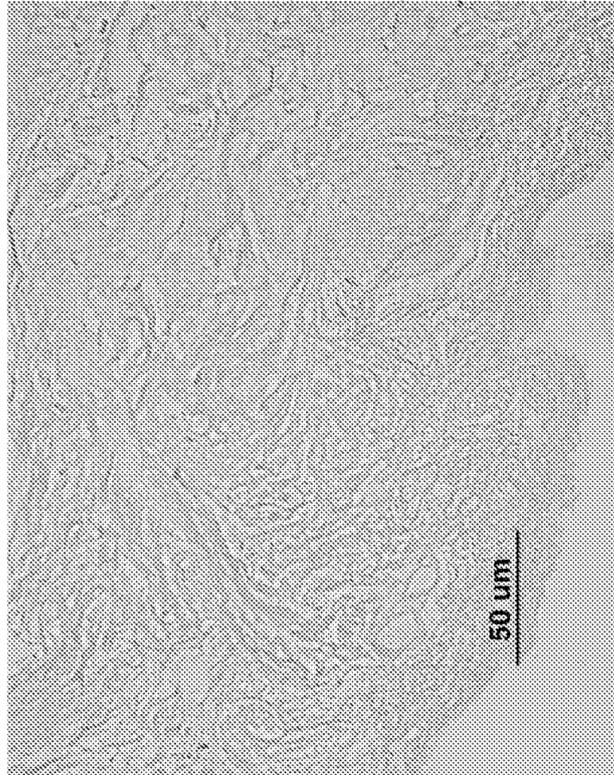


Figura 11

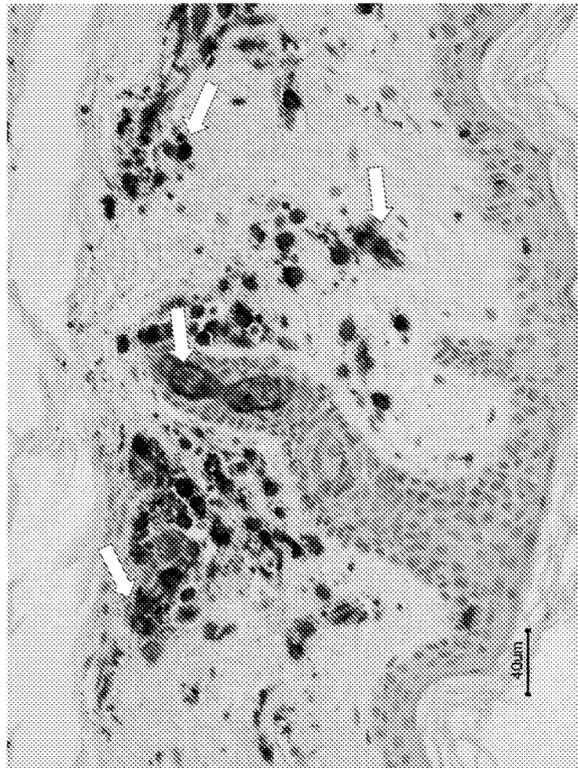
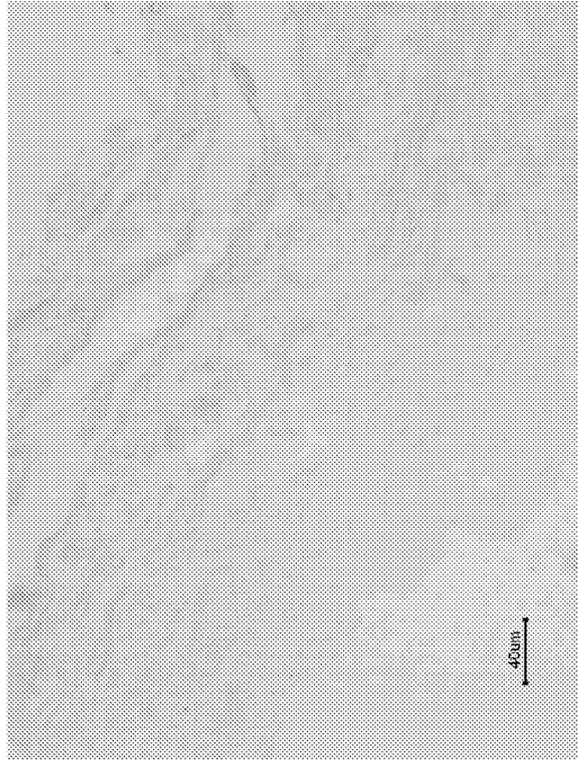
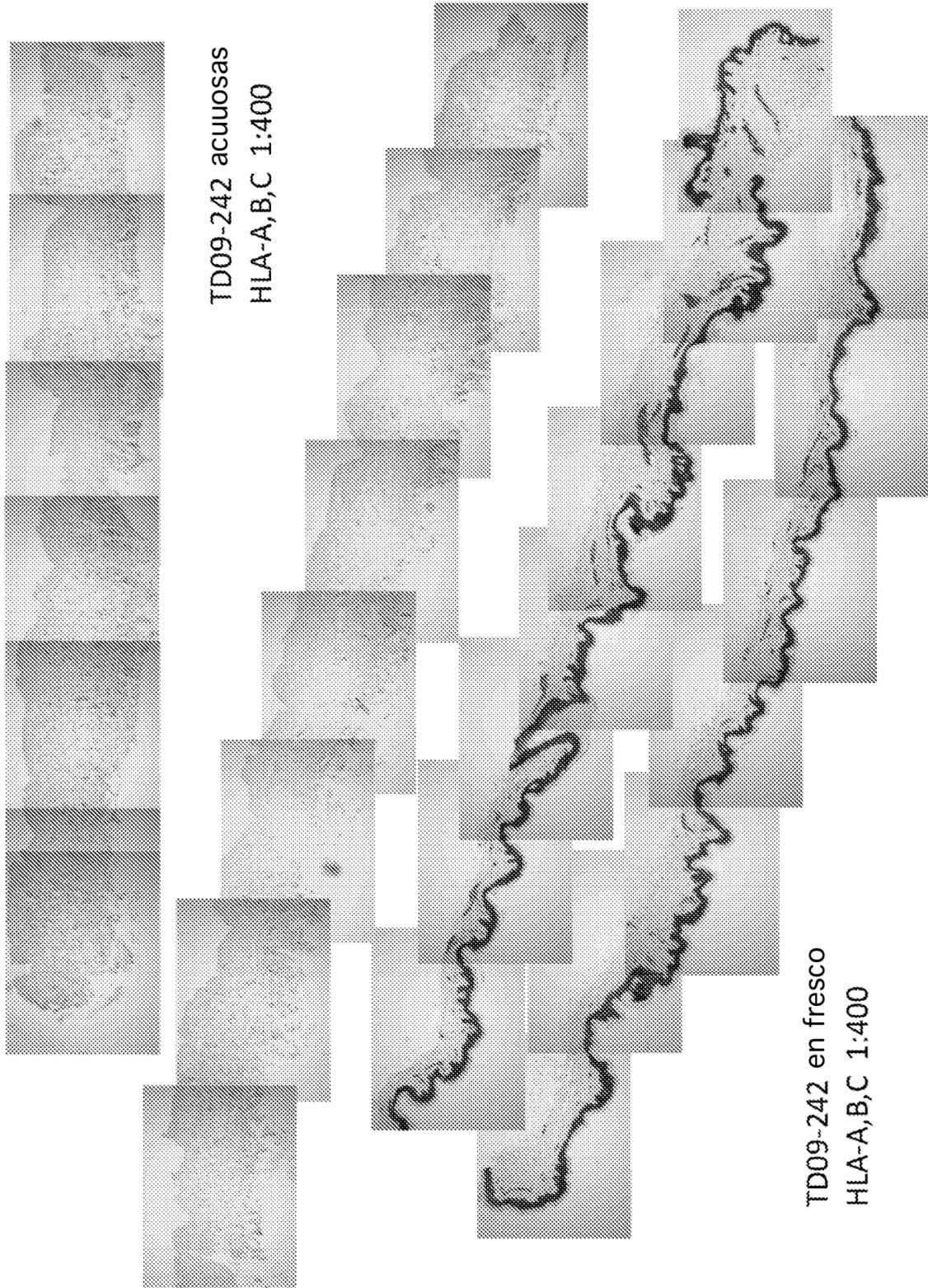


Figura 12

10X



TD09-242 acuuosas
HLA-A,B,C 1:400

TD09-242 en fresco
HLA-A,B,C 1:400

Figura 13