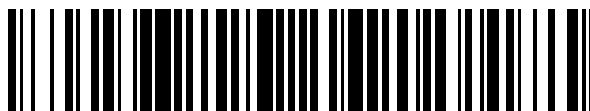


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 791 312**

51 Int. Cl.:

A61K 9/14 (2006.01)
A61L 27/36 (2006.01)
A61L 27/00 (2006.01)
A61L 27/24 (2006.01)
C12M 3/00 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
C12N 5/02 (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01)
C12N 5/09 (2010.01)
C12N 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2011** **E 16191506 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020** **EP 3216444**

54 Título: **Andamios de biomatriz para la dispersión a escala industrial**

30 Prioridad:

02.07.2010 US 360939 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.11.2020

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT
CHAPEL HILL (33.3%)
Office of Technology Commercialization, 109
Church Street
Chapel Hill, NC 27516, US;
ROACH, MARSHA LYNN (33.3%) y
MALAVARCA, RICHARD HAROLD (33.3%)**

72 Inventor/es:

**ROACH, MARSHA LYNN;
MALAVARCA, RICHARD HAROLD;
WANG, YUNFANG y
REID, LOLA CYNTHIA MCADAMS**

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 791 312 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

Andamios de biomatriz para la dispersión a escala industrial

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a métodos para producir andamios de biomatriz.

Antecedentes de la invención

10 La capacidad de usar células diferenciadas *ex vivo* o en programas clínicos tales como terapias celulares, depende de la capacidad de mantener las células con un fenotipo adulto y completamente funcional o la capacidad de restringir el linaje de las células madre o progenitoras ("madres/progenitoras") para lograr ese fenotipo adulto. La revolución continua en la investigación de células madre ha hecho posible la identificación y el aislamiento de poblaciones de células madre/progenitoras que incluyen las de tejidos embrionarios, fetales y postnatales¹. La capacidad de identificar y aislar las madres/progenitoras de todos los tipos de células adultas y expandirlas y diferenciarlas aumenta en gran medida el potencial de su uso en programas de investigación farmacéutica e industrial, en investigaciones académicas y en programas clínicos tales como terapias basadas en células e ingeniería de tejidos².

20 Los métodos actuales para mantener células diferenciadas o restringir el linaje de células madre a un destino adulto *ex vivo* son parcialmente exitosos e involucran la siembra de las células sobre o incrustadas en un sustrato de uno o más componentes de la matriz extracelular y en un medio que comprende hormonas específicas, factores de crecimiento y nutrientes adaptados para el fenotipo adulto deseado. Para las células madre muy primitivas tales como células madre embrionarias (ES) o madre pluripotentes inducidas (iPS) o las derivadas posnatalmente que pueden ir a múltiples destinos adultos, tales como células madre mesenquimales (MSC) o células madre derivadas del líquido amniótico (AFSC), las células madre se someten a una mezcla de señales solubles y/componentes de la matriz extracelular y deben tratarse con múltiples conjuntos de estas señales durante semanas de tiempo. Típicamente, el fenotipo adulto logrado es distinto con cada preparación y tiene sobreexpresión o subexpresión de determinados genes específicos de adultos y/o regulación aberrante de uno o más de los genes específicos de tejidos adultos.

30 La matriz extracelular es secretada por las células, es adyacente a ellas en una o más de sus superficies y desde hace tiempo se ha entendido que es el soporte estructural de las células⁷. Es un andamio extraordinariamente complejo compuesto por una variedad de moléculas biológicamente activas que están altamente reguladas y son críticas para determinar la morfología, el crecimiento y la diferenciación de las células adheridas⁸. La expresión génica específica del tejido en células cultivadas se mejora mediante el cultivo de las células en extractos de matriz o con componentes de la matriz purificados⁹. Sin embargo, los componentes de la matriz individuales, solos o en combinación, no pueden recapitular la compleja composición química y la arquitectura de la matriz de un tejido. Esto se relaciona con el hecho de que los componentes de la matriz están en gradientes asociados con zonas tisulares naturales y con estructuras histológicas tales como los vasos sanguíneos. Esta complejidad de la matriz tisular se logra más fácilmente mediante extracciones que eliminan las células de un tejido y dejan atrás la matriz como un residuo^{10,11}. Sin embargo, los protocolos de descelularización actuales dan lugar a pérdidas importantes de algunos de los componentes de la matriz debido al uso de enzimas que degradan la matriz o tampones que solubilizan los componentes de la matriz. Se conoce del estado de la técnica (Ross y otros, J.A.M. Soc. Nephrol 2009, 20, 11, 2338-2347 y Shupe, Organogenesis, 2010, 6, 2, 134-136) cómo usar tratamientos con SDS y un Tritón o con SDS solo (documento WO2010/039823). Sin embargo, estos detergentes fuertes pueden dañar la matriz extracelular.

La presente invención proporciona métodos para preparar andamios de biomatriz. Los métodos de esta invención dan lugar a la producción de un extracto específico de tejido enriquecido en una mayoría de los colágenos del tejido y con componentes de la matriz unidos y hormonas, factores de crecimiento y citocinas unidos a la matriz que colectivamente producen efectos de diferenciación más reproducibles y potentes en células maduras y en la restricción del linaje de poblaciones de células madre/progenitoras.

Resumen de la invención

55 La presente invención proporciona un método para producir un andamio de biomatriz a partir de tejido biológico seleccionado del grupo que consiste en: páncreas, árbol biliar y duodeno para la dispersión a escala industrial (por ejemplo, dispersión a escala industrial que emplea volúmenes como se describe, por ejemplo, en los protocolos expuestos en el Ejemplo 2) sobre un aparato de cultivo, que comprende: a) perfundir el tejido biológico u homogeneizar el tejido biológico con un tampón que comprende una concentración de sal de aproximadamente 3,5 M de NaCl a aproximadamente 4,5 M de NaCl; b) perfundir el tejido biológico o extraer el homogeneizado de la etapa (a) con un tampón deslipidante que comprende desoxicolato de sodio y fosfolipasa A2 en un primer medio, en donde la osmolalidad de dicho primer medio es de aproximadamente 250 mOsm/kg a aproximadamente 350 mOsm/kg y dicho primer medio está libre de suero y a pH neutro; después

c) perfundir el tejido o extraer el homogeneizado de la etapa (b) con un tampón a un pH neutro y que comprende una concentración de sal de aproximadamente 2,0 M de NaCl a aproximadamente 5,0 M de NaCl, la concentración elegida para mantener insolubles los colágenos identificados en el tejido biológico; después

5 d) perfundir el tejido o extraer el homogeneizado de la etapa (c) con RNasa y DNasa en un tampón; y después

e) enjuagar el tejido u homogeneizado de la etapa (d) con un segundo medio que está a pH neutro, está libre de suero y tiene una osmolalidad de aproximadamente 250 mOsm/kg a aproximadamente 350 mOsm/kg,

10 f) diluir el andamio de biomatriz en medio basal;

g) congelar el andamio de biomatriz de (f) (por ejemplo, a aproximadamente -80 °C);

15 h) pulverizar el andamio de biomatriz de (g) mediante trituración criogénica en partículas de biomatriz que varían en tamaño de aproximadamente 1 µm a aproximadamente 100 µm;

i) descongelar las partículas de biomatriz de (h) en suspensión en medio basal; y

20 j) dispersar las partículas de biomatriz de la etapa (i) sobre un aparato de cultivo,

para producir así un andamio de biomatriz a partir de tejido biológico para la dispersión (por ejemplo, dispersión a escala industrial como se describe en la presente descripción) sobre el aparato de cultivo.

Se describe el andamio de biomatriz producido por los métodos de esta invención.

25 Los anteriores y otros aspectos de la presente invención se describirán ahora en más detalle con respecto a otras modalidades descritas en la presente descripción. Debe apreciarse que la invención puede realizarse de diferentes formas y no debe interpretarse como limitada a las modalidades expuestas en la presente descripción. Más bien, estas modalidades se proporcionan de manera que esta descripción será exhaustiva y completa, y transmitirá
30 completamente el alcance de la invención a los expertos en la técnica.

Breve descripción de las figuras

Figuras 1A-E1. Preparación de andamios de biomatriz de hígado de rata. **(A)** Proceso de descelularización en cuatro etapas que comprende lavado por perfusión, deslipidación con PLA2 y SDC, lavado con alto contenido de sal y tratamiento con nucleasas para la eliminación de ácidos nucleicos. **(B-D)** Cuatro etapas en la preparación del andamio de biomatriz de rata. **(B)** Después del lavado por perfusión con medio basal durante 10 minutos el hígado se vuelve pálido; **(C)** durante la deslipidación, el hígado se vuelve parcialmente transparente debajo de GC **(D)** el andamio intacto final parece transparente a los 40 minutos de perfusión; **(E)** andamio de biomatriz mostrado a poco aumento. **(E1)** La visualización del andamio perfundido con partículas de dextrano etiquetadas con rodamina demuestra un flujo progresivo sin fugas desde los vasos grandes hasta las ramificaciones de vasos sanguíneos finos a lo largo de los canales, lo que indica una vasculatura permeable en los andamios. La tinción correspondiente con hematoxilina y eosina (H&E) del andamio de biomatriz en diferentes etapas, demostró que las estructuras histológicas tales como vasos sanguíneos y matriz similar a un encaje que envuelve el parénquima se conservan, mientras que las células se eliminan. La estructura normal de la triada portal hepática de rata que consiste en la vena porta (PV), la arteria hepática (HA) y el conducto biliar (BD) **(B1)**; las fibras de la matriz se vuelven evidentes a medida que las células se eliminan gradualmente durante el proceso de descelularización **(C1)**; región de la triada portal descelularizada, comparar **(B1)** con la de **(D1)**; **D2 y D3** muestran que todas las células se eliminan del andamio de matriz pero las estructuras reticulares se conservan tales como los vasos sanguíneos, GC, y la matriz similar a un encaje que rodea la pared de células parenquimales.

Figuras 2A-H. Imágenes de TEM **(A-C)** y SEM **(D-H)** de andamios de biomatriz de hígado de rata. **(A)** Vaso sanguíneo (BV) a poco aumento con una pared gruesa (W). El colágeno tipo I (punta de flecha grande) es numeroso y contiene secciones transversales de fibras individuales que no absorben colorantes de metales pesados (puntos blancos, puntas de flecha pequeñas). **(B)** Un aumento mayor de la pared de un vaso muestra membrana basal (flecha grande), elastina amorfa (*) y fibras elásticas asociadas, un resto de vesícula de membrana raro (punta de flecha pequeña), una fibra con bandas de colágeno tipo I (punta de flecha) y fibrillas pequeñas (flechas pequeñas). Las fibrillas pequeñas probablemente son de fibrilina (colágeno tipo VI) que se asocia estrechamente con y ayuda a organizar el colágeno tipo I. **(C)** Colágeno tipo I a gran aumento con un patrón de bandas de 64 nm (flechas). **(D)** Vaso a poco aumento con pared delgada (BV) y la pared de un vaso más grande (W). **(E)** A mayor aumento, la pared del vaso grande (W) es festoneada, consistente con la arteria hepática de una triada portal, ver **(A)**. Debajo de la pared hay numerosos haces de colágeno tipo I (flecha grande) unidos por fibrillas de colágeno (Tipo III) reticulares, delgadas, de ramificaciones largas, (flechas pequeñas). **(F)** Un haz grande de colágeno tipo I tiene fibras paralelas características (flecha grande) asociadas con una variedad de fibras más pequeñas (flecha) y fibras nodulares o en forma de cuentas (punta de flecha). **(G)** Red 3D de fibras grandes/pequeñas interconectadas en un plano que forma un límite tal como para un

sinusoide hepático. **(H)**. Un aumento mayor de la red que muestra una variedad de fibras (flechas): Colágeno tipo III (rectas de diámetro más grande), fibras elásticas o colágeno tipo VI.

Figuras 3A-B. Análisis químico de los colágenos y expresión de los componentes de la matriz extracelular (ECM) en los andamios de biomatriz. **(A)** El contenido de tres aminoácidos, todos encontrados en colágenos: hidroxiprolina (Hyp), hidroxilisina (Hyl) y glicina (Gly). Los números representan los residuos de cada aminoácido/1000 aminoácidos. Los datos indican el aumento drástico en el contenido de colágeno en el proceso de descélularización que va de <0,2 % en el hígado a más de 15 % en los andamios de biomatriz. **(B)** La tinción inmunohistoquímica de las moléculas de la matriz en los andamios de biomatriz, muestra la distribución en andamios de biomatriz de hígado de laminina (LAM), sulfato de heparán (HS), colágeno tipo III (COL3) y fibronectina (FN) y proteínas de membrana basal típicas en asociación con restos de vasos sanguíneos. A mayor aumento, se pueden observar los miembros principales de la membrana basal, que incluyen colágeno tipo IV (COL4), entactina (Ent; también llamada nidógeno), laminina (LAM) y perlecán (Per), una forma de HS-PG en la porción de los andamios cerca de las triadas portales.

Figuras 4A-D. Patrón de componentes de ECM desde la triada portal hasta la vena central en los andamios de biomatriz. Comparación histológica desde la triada portal (zona 1) hasta la vena central (zona 3) de hígado normal **(A)** y andamio de biomatriz de hígado **(B)** ambas son secciones teñidas con hematoxilina/eosina. **(C)** El modelo ilustra un sistema de células madre y maduración del linaje en el hígado con componentes de la matriz representativos mostrados que forman patrones asociados con la zonificación del hígado. Los componentes se enumeran en orden de abundancia a partir de los hallazgos de la inmunohistoquímica. Las etapas de linaje conocidas en hígados humanos comienzan periportalmente en la zona 1 (alrededor de las triadas portales) y el progreso en la maduración termina con las células apoptóticas en la zona 3. La composición química conocida de la matriz identificada en el nicho de células madre del hígado comprende hialuronanos, colágeno tipo III, una forma de laminina que se une a $\alpha 6 \beta 4$ integrina, y una forma débilmente sulfatada de CS-PG^{43,44}. Justo fuera del nicho de células madre se encuentran colágeno tipo IV, CS-PG y HS-PG sulfatados normalmente y formas de laminina que se unen a la $\alpha \beta 1$ integrina. Se ha documentado que los HP-PG se ubican de manera exclusiva en el pericentro^{45,46}. **(D)** El estudio de los componentes de la matriz y su ubicación en hígado frente a los de los andamios de biomatriz, datos resumidos de los hallazgos de la inmunohistoquímica (N/D=no evaluados. *Otros han encontrado que se encuentra exclusivamente cerca de las venas centrales). La mayoría de los componentes del citoesqueleto se pierden durante los lavados, hay presencia de residuos de algunas, pero no todas, las proteínas del citoesqueleto. Los andamios carecen de cantidades detectables de tubulina, desmina y actina (ensayos de faloidina). Sin embargo, hay cantidades mínimas de citoqueratinas dispersas aleatoriamente en los andamios; cantidades mínimas de α -actina de músculo liso alrededor de los restos de vasos sanguíneos en las triadas portales; y bajos niveles de vimentina.

Figuras 5E-I. Caracterización de hHpSC en andamios de biomatriz de hígado frente a colágeno tipo I. Las imágenes de contraste de fases **(A-D)** muestran los cambios morfológicos de las colonias de hHpSC derivadas del mismo hígado y cultivadas en medio de Kubota libre de suero y en plástico de cultivo de tejidos **(A)**, una de las condiciones para la autorreplicación, frente a las condiciones de diferenciación del medio de diferenciación libre de suero para el hígado, y en colágeno tipo I **(B)** frente a andamios de biomatriz de hígado bovino **(C-E)**. Los cultivos funcionales y completamente viables no duraron más de ~2 semanas en colágenos tipo I. Por el contrario, los de los andamios de biomatriz de hígado fueron viables y sanos y con un repertorio completo de funciones que duran al menos un mes. Los cultivos transitaban a células en los días 7-12 con un aumento de la relación citoplasma/núcleo y expresión de glucógeno marcada **(C)** y después a unas con la clásica morfología poligonal de los hepatocitos intercaladas con canalículos biliares claros **(D)**, una morfología del cultivo que persistió después de eso, como se indica en el cultivo representativo en el día 24 **(E)**. Los ensayos de RT-PCR muestran cambios en la expresión génica de hHpSC en condiciones de autorreplicación en plástico de cultivo **(F)** frente a andamios de biomatriz de hígado de rata en el día 7 **(G)**. Se comparó la expresión de marcadores de hHpSC, que incluyen CXCR4 y EpCAM; genes hepatocíticos tempranos que incluyen CK19 (KRT19), HNF6, FOXA2, AFP y bajos niveles de albúmina; marcadores hepatocíticos maduros que incluyen altos niveles de albúmina (ALB), transferrina (TF), CYP450-3A4, tirosina aminotransferasa (TAT), y glucosa-6-fosfatasa (G6PC) y genes colangiocíticos, que incluyen CFTR, gamma glutamil transpeptidasa (GGTi), intercambio de aniones 2 (EA2) y transportador apical de ácidos biliares dependiente de sodio (ASBT). Ensayos bioquímicos que miden la urea **(H)** sintetizada en cultivos en colágeno tipo I frente a los andamios de biomatriz de hígado de rata y actividad de CYP450-3A4 **(I)** en cultivos en colágeno tipo I frente a los andamios de biomatriz preparados a partir de hígados de rata o bovinos. La **Tabla 7** proporciona un resumen de las mediciones cuantitativas que comparan la adhesión, viabilidad, crecimiento, vida útil del cultivo y expresión génica específica del tejido de hHpSC recién aisladas, en condiciones de cultivo para la autorreplicación (colágeno tipo III) o en condiciones para la diferenciación en colágeno I, frente a andamios de biomatriz de hígado.

Figuras 6A-D. Tinción de inmunofluorescencia de células de linaje restringido a partir de hHpSC en andamios de biomatriz. **(A)** Tinción con marcador hepático específico: albúmina (Alb, gris claro) y marcador de superficie de células madre hepáticas: EpCAM (blanco). Nótese que las células sembradas en el andamio de biomatriz no expresan EpCAM. Barra de escala=200 μ m. **(B)** Tinción con el marcador hepático temprano α -fetoproteína (AFP, gris claro) y con un anticuerpo contra un marcador de colangiocitos humanos, la citoqueratina 19 (CK19, blanco), que a este nivel de expresión es indicativo de colangiocitos maduros. El anticuerpo para el ensayo de CK19 es específico de humanos y no tiñó el residuo en CK19 de rata en los andamios que no se sembraron con células. La expresión de AFP es baja pero aún evidente en el día 7. Barra de escala=200 μ m. **(C)** Tinción con Alb (gris claro) y marcador de células

estrelladas hepáticas, a- actina de músculo liso (ASMA, blanco). La expresión de albúmina y ASMA es un indicio fuerte de la presencia de hepatocitos y células estrelladas en maduración. Barra de escala=100 µm. **(D)** Tinción con proteína hepática funcional CYP450-3A4 (gris claro) y marcador específico de colangiocitos, receptor de secretina (SR, blanco) que muestra que los hepatocitos y los colangiocitos en maduración son funcionales y expresan los marcadores clásicos para estos dos tipos de células. Barra de escala=200 µm.

Figuras 7A-D. Estabilidad de hepatocitos humanos maduros completamente funcionales en andamios de biomatriz. Hepatocitos humanos adultos sembrados en el medio de diferenciación y sobre colágeno tipo I **(A,B)** frente a andamios de biomatriz de hígado bovino **(C)** que se pulverizaron criogénicamente, se dispersaron en medio y se dejaron sedimentar sobre las placas. Las células en colágeno tipo I son completamente viables y en su máximo de diferenciación de 7-12 días **(A)**-se muestra a los 7 días; comienzan a deteriorarse después de ~2 semanas y a los 20 días **(B)** están muertas, muriendo y no son funcionales. Por el contrario, las sembradas sobre los andamios de biomatriz de hígado **(C)** son funcionales durante al menos 8 semanas (todavía no se han evaluado tiempos más largos); aquí se muestran después de 21 días en cultivo en andamios de biomatriz de hígado pulverizados. Ensayos de CYP450-3A4 en cultivos de dos preparaciones separadas de células hepáticas humanas adultas crioconservadas sembradas sobre andamios de biomatriz frente a colágeno tipo I y analizadas en el día 12 **(D)**. La muestra ZHep-007 es representativa de las muestras crioconservadas con buena adhesión después de la descongelación; la muestra ZL-013 es representativa de los lotes que tienen poca o ninguna adhesión después de la descongelación. Por lo tanto, incluso estas muestras de inferior calidad pueden adherirse a los andamios de biomatriz y permanecer viables a largo plazo. En ambas muestras analizadas, los niveles de P450 son mayores cuando se cultivan en andamios de biomatriz de hígado. Con tiempo sobre los andamios de biomatriz, los lotes de células crioconservadas de inferior calidad mejorarán.

Figura 8. Activación de fosfolipasa A2 con desoxicolato de sodio para producir lisolecitina. Principio del protocolo: La fosfolipasa A2 (PLA2) activada con desoxicolato de sodio degradará el fosfoglicérido ubicado en la membrana citoplasmática y la membrana mitocondrial a lisolecitina, un tensioactivo poderoso, que induce la necrosis celular.

Figura 9. Análisis de la composición de colágeno de hígados de rata frente a andamios de biomatriz de hígado de rata. La composición de aminoácidos de la biomatriz (negro) y del hígado completo (gris claro) se presenta en forma de un diagrama de rosa. Se usa una abreviatura de tres letras para cada aminoácido analizado. Triptófano y cisteína no se analizaron. Los números indican los residuos de aminoácidos/1000.

Figuras 10A-C. Análisis de ácidos nucleicos del andamio de biomatriz de hígado de rata. Foto de contraste de fases **(A)** y tinción fluorescente con DAPI **(B)** del portaobjetos con biomatriz de hígado, y ensayos cuantitativos de ADN y ARN totales de tejido hepático de rata fresco frente al andamio de biomatriz **(C)**.

Figuras 11A-C. Tinción del andamio de biomatriz después de la siembra de hHpSC sobre el andamio de biomatriz. El ensayo de Vivas (calceína-AM, blanco)/Muertas (bromuro de etidio o EtD-Br₁, gris claro) indica que las colonias de hHpSC eran viables en las secciones de andamio de biomatriz pero no se absorbía colorante en el medio de las colonias **(A,B)** durante los primeros días debido a las bombas conocidas en las células madre (por ejemplo, MDR1) que eliminan los colorantes vitales. En **(B)** la imagen de fluorescencia se fusiona con la fase uno para indicar que el centro de la colonia contiene células. En el día 7, las células en toda la colonia se habían diferenciado y absorbieron el colorante vital en casi todas las células en toda la colonia **(C)**.

Figuras 12A-F. Comparación de hepatocitos de rata cultivados en colágeno tipo I con hepatocitos de rata cultivados en andamios de biomatriz de hígado de rata. Hepatocitos de rata adultos cultivados en colágeno tipo I y andamio de biomatriz en el día 3 **(A,C)** y el día 10 **(B,D)**. Se adhirieron en varios minutos en los andamios de biomatriz de hígado y sobrevivieron durante todo el tiempo que se evalúa, más de 8 semanas **(C,D)** no se evaluaron períodos de tiempo más largos. Los cultivos son muy tridimensionales en los andamios de biomatriz. Ensayo de síntesis de urea **(E)** y de viabilidad celular **(F)** en el día 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21 y 28, n=3.

Figuras 13A-D. Comparación de un páncreas humano con un andamio de biomatriz pancreática humana. Páncreas humano **(A)** frente a andamio de biomatriz pancreática humana **(B-D)** incrustado en parafina, cortado en secciones y teñido con hematoxilina y eosina (H&E). Las estructuras de los islotes se han descrito en **B**. Las regiones acinares de los andamios de biomatriz pancreática se muestran en **C** y **D**.

Figura 14. Comparación de componentes de la matriz representativos y un componente del citoesqueleto, vimentina, que se encuentra en tejido pancreático humano frente a andamios de biomatriz pancreática de rata. Otros componentes del citoesqueleto (desmina, tubulina, actina) no se encontraron en cantidades detectables o se encontraron en cantidades mínimas (citoqueratinas). Las líneas discontinuas rodean los islotes, nótese que el sindecano 1 y el colágeno tipo VI son fuertemente positivos en los islotes tanto en el tejido pancreático como en los andamios de biomatriz. El sindecano 1 se encuentra solo en los islotes (línea discontinua) pero no en las células acinares (flechas); el colágeno tipo III se encuentra más enriquecido en las células acinares y alrededor de los vasos sanguíneos (flechas), pero no en los islotes.

Figuras 15A-C. Tinción histológica e inmunohistoquímica del andamio de biomatriz de duodeno humano. **(A)** Lado exterior y luminal del andamio de biomatriz de duodeno humano. Las estructuras multicapa entre el tejido normal **(B)** y el andamio de biomatriz **(C)** se compararon en secciones teñidas con H&E y los resultados muestran que los andamios retuvieron la vellosidad y los vasos sanguíneos en las capas mucosa y submucosa. Los paneles inferiores muestran que la tinción inmunohistoquímica del andamio de biomatriz de duodeno humano indicó cantidades variables de proteínas de la matriz extracelular retenidas en el andamio.

Figuras 16A-D. Comparación de un tejido de vesícula biliar humana con un andamio de biomatriz de vesícula biliar humana. Tejido de vesícula biliar humana **(A, B)** frente a andamios de biomatriz **(D,D)** preparados a partir de este. El tejido y los andamios de biomatriz se incrustaron en parafina, se cortaron en secciones y se tiñeron con hematoxilina y eosina.

Figura 17. Ejemplo de preparación de solución de biomatriz para una dilución 1:24. 30 ml x 3 = 90 ml. 30 ml de biomatriz + 90 ml de Solución 5 = 120 ml de solución de biomatriz para una dilución 1:24.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se describirá ahora más completamente a continuación. Sin embargo, esta invención puede realizarse de diferentes formas y no debe interpretarse como limitada a las modalidades expuestas en la presente descripción. Más bien, estas modalidades se proporcionan de manera que esta descripción será exhaustiva y completa, y transmitirá completamente el alcance de la invención a los expertos en la técnica.

La terminología usada en la descripción de la invención en la presente descripción es solamente con el propósito de describir modalidades particulares y no pretende ser limitante de la invención. Como se usa en la descripción de la invención y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” pretenden incluir también las formas plurales, a menos que el contexto claramente lo indique de otro modo.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos (que incluyen términos técnicos y científicos) usados en la presente descripción tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Se entenderá además que los términos, tales como los definidos en los diccionarios usados comúnmente, deben interpretarse como que tienen un significado que es consistente con su significado en el contexto de la presente solicitud y la técnica en cuestión y no deben interpretarse en un sentido idealizado o excesivamente formal a menos que así se defina expresamente en la presente descripción. La terminología usada en la descripción de la invención en la presente descripción es solamente con el propósito de describir modalidades particulares y no pretende ser limitante de la invención. Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes y otras referencias mencionadas en la presente descripción se incorporan como referencia en su totalidad.

Además, como se usa en la presente descripción, “y/o” se refiere a y abarca cualquiera y todas las combinaciones posibles de uno o más de los elementos enumerados asociados, así como la ausencia de combinaciones cuando se interpreta en la alternativa (“o”).

A menos que el contexto lo indique de otro modo, se pretende específicamente que las diversas características de la invención descrita en la presente descripción puedan usarse en cualquier combinación. Por otra parte, la presente invención contempla, además, que en algunas modalidades de la invención, cualquier característica o combinación de características expuesta en la presente descripción puede excluirse u omitirse. Para ilustrar, si la descripción establece que un complejo comprende los componentes A, B y C, se pretende específicamente que cualquiera de A, B o C, o una combinación de los mismos, pueda omitirse y excluirse de manera individual o en cualquier combinación.

Como se usa en la presente descripción, la frase de transición “que consiste esencialmente en” (y variantes gramaticales) debe interpretarse como que abarca los materiales o etapas mencionados “y aquellos que no afectan materialmente la(s) característica(s) básica(s) y novedosa(s)” de la invención reivindicada. Ver, *In re Herz*, 537 F.2d 549, 551-52, 190 U.S.P.Q. 461, 463 (CCPA 1976) (énfasis en el original); ver además MPEP § 2111.03. Por lo tanto, el término “que consiste esencialmente en” como se usa en la presente descripción no debe interpretarse como equivalente a “que comprende”.

El término “aproximadamente”, como se usa en la presente descripción, cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad o concentración (*por ejemplo*, el porcentaje de colágeno en las proteínas totales en el andamio de biomatriz) y similares, pretende abarcar variaciones de 20 %, 10 %, 5 %, 1 %, 0,5 % o incluso 0,1 % de la cantidad especificada.

La presente invención se dirige al descubrimiento y desarrollo de un andamio de biomatriz que tiene mejoras y ventajas inesperadas respecto a los andamios de tejido descelularizado conocidos en la actualidad, algunos ejemplos de la mejora y ventaja son el uso del andamio de biomatriz de esta invención para mantener de manera eficiente las células maduras y/o para restringir el linaje y/o diferenciar células madre a destinos maduros y/o para mantener tales células maduras como funcionales durante un período de tiempo prolongado. A modo de ejemplo adicional, el uso de los andamios de biomatriz de esta invención reduce el tiempo para producir células de destinos maduros de

aproximadamente tres a seis semanas o más a aproximadamente una a dos semanas. Los andamios de biomatriz de esta invención se producen con el uso de protocolos específicos que emplean el equilibrio apropiado de concentración de sal y fuerza iónica (diferentes colágenos tienen diferentes constantes de solubilidad (23)) para un tejido dado, para permitir la retención de los colágenos naturales presentes en ese tejido en forma insoluble, lo que da lugar a un andamio de biomatriz que retiene un alto porcentaje de colágenos naturales que proporcionan señales para dirigir la restricción del linaje y la diferenciación. Por el contrario, los andamios descelularizados producidos de acuerdo con los protocolos conocidos no emplean tal equilibrio de concentración de sal y fuerza iónica para permitir la retención de un alto porcentaje de estos colágenos naturales y la mayoría de estos colágenos naturales se pierden cuando se usan estos protocolos conocidos. Además, los andamios de biomatriz de esta invención permiten la producción de virus y/o patógenos dependientes del linaje (por ejemplo, dependientes de la diferenciación) en cantidades suficientes para el uso experimental y/o terapéutico (por ejemplo, para la producción de vacunas).

Por lo tanto, en una modalidad, la presente invención proporciona un método para producir un andamio de biomatriz a partir de tejido biológico seleccionado del grupo que comprende: páncreas, árbol biliar y duodeno para la dispersión a escala industrial sobre un aparato de cultivo, que comprende las etapas de:

a) perfundir el tejido biológico u homogeneizar el tejido biológico con un tampón que comprende una concentración de sal de 3,5 M de NaCl a 4,5 M de NaCl, después

b) perfundir el tejido biológico o extraer el homogeneizado de la etapa (a) con un tampón deslipidante que comprende desoxicolato de sodio y fosfolipasa A2 en un primer medio, en donde la osmolalidad de dicho primer medio es de 250 mOsm/kg a 350 mOsm/kg y dicho primer medio está libre de suero y a pH neutro; después

c) perfundir el tejido o extraer el homogeneizado de la etapa (b) con un tampón a un pH neutro y que comprende una concentración de sal de 2,0 M de NaCl a 5,0 M de NaCl, la concentración elegida para mantener insolubles los colágenos identificados en el tejido biológico; después

d) perfundir el tejido o extraer el homogeneizado de la etapa (c) con RNasa y DNasa en un tampón; y después

e) enjuagar el tejido u homogeneizado de la etapa (d) con un segundo medio que está a pH neutro, está libre de suero y tiene una osmolalidad de 250 mOsm/kg a 350 mOsm/kg;

f) diluir el andamio de biomatriz en medio basal;

g) congelar el andamio de biomatriz de (f);

h) pulverizar el andamio de biomatriz de (g) mediante trituración criogénica en partículas de biomatriz que varían en tamaño de 1 µm a 100 µm;

i) descongelar las partículas de biomatriz de (h) en suspensión en medio basal; y

j) dispersar las partículas de biomatriz de la etapa (i) sobre un aparato de cultivo.

En la presente descripción también se describe un andamio de biomatriz producido por cualquiera de los métodos de esta invención.

“Andamio de biomatriz” como se usa en la presente descripción se refiere a un extracto de tejido aislado enriquecido en matriz extracelular, como se describe en la presente descripción, que retiene muchos o la mayoría de los colágenos y los factores unidos al colágeno que se encuentran naturalmente en el tejido biológico. En algunas modalidades esencialmente todos los colágenos y factores unidos al colágeno se retienen y en otras modalidades el andamio de biomatriz comprende todos los colágenos conocidos por estar en el tejido. El andamio de biomatriz puede comprender al menos aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 100 % de los colágenos, componentes de la matriz asociados al colágeno, y/o factores de crecimiento, hormonas y/o citocinas unidos a la matriz, en cualquier combinación, que se encuentran en el tejido biológico natural. En algunas modalidades, el andamio de biomatriz comprende al menos 95 % de los colágenos y la mayoría de los componentes de la matriz asociados al colágeno y factores de crecimiento, hormonas y/o citocinas unidos a la matriz del tejido biológico. Como se describe en la presente descripción, “la mayoría de los componentes de la matriz asociados al colágeno y los factores de crecimiento, hormonas y/o citocinas unidos a la matriz del tejido biológico” se refiere al andamio de biomatriz que retiene aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 100 % de los componentes de la matriz asociados al colágeno y factores de crecimiento, hormonas y/o citocinas unidos a la matriz que se encuentran en el tejido biológico natural (por ejemplo, sin procesar).

Los ejemplos de colágenos incluyen todos los tipos de colágeno, tales como, pero sin limitarse a, los colágenos tipo I a tipo XXIX. El andamio de biomatriz puede comprender al menos aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o más de uno o más de los colágenos que se encuentran en el tejido biológico natural y/o puede tener uno o más de los colágenos presentes a una concentración que es al menos

aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o más de la que se encuentra en el tejido biológico natural. La cantidad de colágeno en el andamio de biomatriz puede determinarse mediante diversos métodos conocidos en la técnica y como se describe en la presente descripción, tal como, pero sin limitarse a, la determinación del contenido de hidroxiprolina.

Los componentes de la matriz asociados al colágeno ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, moléculas de adhesión; proteínas de adhesión; L y P-selectina; molécula asociada al crecimiento de unión a heparina (HB-GAM); repetición de trombospondina tipo I (TSR); amiloide P (AP); lamininas; nidógenos/entactinas; fibronectinas; elastinas; vimentinas; proteoglicanos (PG); sulfato de condroitina- PG (CS-PG); sulfato de dermatán-PG (DS-PG); miembros de la familia de proteoglicanos pequeños ricos en leucina (SLRP) tales como biglicano y decorinas; heparina-PG (HP-PG); sulfato de heparán-PG (HS-PG) tales como glipicanos, sindecanos y perlecanos; y glicosaminoglicanos (GAG) tales como hialuronanos, sulfatos de heparán, sulfatos de condroitina, sulfatos de queratina y heparinas. En algunas modalidades, el andamio de biomatriz comprende, consiste en, o consiste esencialmente en colágenos, fibronectinas, lamininas, nidógenos/entactinas, elastinas, proteoglicanos, glicosaminoglicanos, factores de crecimiento, hormonas y citocinas (en cualquier combinación) unidos a diversos componentes de la matriz. El andamio de biomatriz puede comprender al menos aproximadamente 50 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o más de uno o más de los componentes de la matriz asociados al colágeno, hormonas y/o citocinas que se encuentran en el tejido biológico natural y/o puede tener uno o más de estos componentes presentes en una concentración que es al menos aproximadamente 50 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o más de la que se encuentra en el tejido biológico natural. En algunas modalidades, el andamio de biomatriz comprende todos o la mayoría de los componentes de la matriz asociados al colágeno, hormonas y/o citocinas conocidos por estar en el tejido. En otras modalidades el andamio de biomatriz comprende, consiste esencialmente en, o consiste en uno o más de los componentes de la matriz asociados al colágeno, hormonas y/o citocinas a concentraciones cercanas a las que se encuentran en el tejido biológico natural (por ejemplo, aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 100 % de la concentración que se encuentra en el tejido natural).

Los factores de crecimiento ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factores de crecimiento nervioso (NGF), factores de crecimiento epidérmico (EGF), factores de crecimiento transformantes, factores de crecimiento de hepatocitos (HGF), factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento similares a la insulina (IGF), proteínas de unión a IGF, factores de crecimiento de fibroblastos básicos y factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Las citocinas ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, interleucinas, linfocinas, monocinas, factores estimulantes de colonias, quimiocinas, interferones y factor de necrosis tumoral (TNF). El andamio de biomatriz puede comprender al menos aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 100 % o más (en cualquier combinación) de uno o más de los factores de crecimiento y/o citocinas unidos a la matriz que se encuentran en el tejido biológico natural y/o puede tener uno o más de estos factores de crecimiento y/o citocinas (en cualquier combinación) presentes a una concentración que es al menos aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 100 % o más de la que se encuentra en el tejido biológico natural. En algunas modalidades el andamio de biomatriz comprende niveles fisiológicos o niveles casi fisiológicos de muchos o la mayoría de los factores de crecimiento, hormonas y/o citocinas unidos a la matriz conocidos por estar en el tejido natural y/o detectados en el tejido y en otras modalidades el andamio de biomatriz comprende uno o más de los factores de crecimiento, hormonas y/o citocinas unidos a la matriz a concentraciones cercanas a las concentraciones fisiológicas que se encuentran en el tejido biológico natural (por ejemplo, que difieren en no más de aproximadamente 30 %, 25 %, 20 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 % en comparación). La cantidad o concentración de los factores de crecimiento o citocinas presentes en el andamio de biomatriz puede determinarse mediante diversos métodos conocidos en la técnica y como se describe en la presente descripción, tal como pero sin limitarse a, diversos ensayos de anticuerpos y ensayos de factores de crecimiento.

“Tejido biológico”, como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier tejido de un organismo vivo o muerto o cualquier tejido derivado de un organismo vivo o muerto. El término “tejido biológico natural” y variaciones del mismo, como se usa en la presente descripción, se refiere al tejido biológico tal y como existe en su estado natural o no modificado en el organismo. Los andamios de biomatriz de la presente invención pueden prepararse a partir de cualquier tejido biológico. El tejido biológico puede incluir cualquier tejido individual (*por ejemplo*, una colección de células que pueden estar interconectadas) o un grupo de tejidos que constituyen un órgano o parte o región del cuerpo de un organismo. El tejido puede comprender un material celular homogéneo o puede ser una estructura combinada tal como la que se encuentra en regiones del cuerpo que incluyen el tórax que puede incluir, por ejemplo, tejido pulmonar, tejido esquelético y/o tejido muscular.

Los tejidos biológicos ilustrativos de esta invención incluyen, pero no se limitan a, hígado, pulmón, tiroides, piel, páncreas, vasos sanguíneos, vejiga, riñones, cerebro, árbol biliar, duodeno, aorta abdominal, vena ilíaca, corazón e intestinos, que incluyen cualquier combinación de los mismos. El organismo (*es decir*, el sujeto) con el que se asocia o del cual se deriva el tejido biológico puede ser cualquier animal, que incluye mamíferos y no mamíferos tales como invertebrados.

Los sujetos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, mamíferos, tales como, pero sin limitarse a, seres humanos, ratones, ratas, hurones, hámsteres, conejos, cobayas, cerdos, porcinos, perros, gatos, caballos, vacas, ovejas, monos

y chimpancés, y no mamíferos tales como, pero sin limitarse a aves, reptiles y animales invertebrados. El sujeto puede ser de cualquier edad y/o tamaño. El tejido biológico puede ser sano, enfermo y/o tener mutaciones genéticas. En algunas modalidades, los andamios de biomatriz de la presente invención son específicos de tejidos en su composición química y funcionalidad, *es decir*, los andamios de biomatriz son representativos o comparables al tejido biológico del cual se crearon en términos de su composición química y funcionalidad.

En algunas modalidades, la histología natural y las vasculaturas permeables se mantienen en los andamios de biomatriz. Esto puede incluir los restos reconocibles de las entidades histológicas principales del tejido biológico, tales como pero sin limitarse a, vasos sanguíneos y otra vasculatura de cualquier tejido; conductos biliares y cápsula de Glisson (GC) del hígado; conductos pancreáticos, islotes y acinos del páncreas; bronquios, tráquea y alveolos de los pulmones, etcétera. En otras modalidades la composición química del andamio de biomatriz coincide con la histología (*por ejemplo*, la matriz alrededor de los vasos sanguíneos es distinta a la de los hepatocitos). En algunas modalidades, la composición química del andamio de biomatriz está en un gradiente que se correlaciona con la histología. Por ejemplo, cuando el tejido biológico es el hígado, el andamio de biomatriz puede retener el gradiente en la composición química de la matriz en correlación con las zonas acinares hepáticas 1-3 desde la triada portal hasta la vena central y con entidades histológicas tales como los canales vasculares y la cápsula de Glisson (GC). Ejemplos adicionales incluyen, pero no se limitan a, vasos sanguíneos donde la composición química de la matriz alrededor de los vasos sanguíneos está saturada con altos niveles de colágenos en red (*por ejemplo*, tipo IV y tipo VI), elastinas y formas de HS-PG; alrededor de los hepatocitos en la zona periportal (zona 1), donde las lamininas son altas en concentración junto con una mezcla de CS-PG y HS-PG, mientras que alrededor de la zona pericentral (zona 3), hay hepatocitos rodeados por una mezcla de HS-PG y HP-PG; asociadas con los conductos biliares donde existen altos niveles de colágeno tipo I, hay fibronectinas y formas de CS-PG y DS-PG. Hay gradientes paralelos en la composición química de la matriz en cada tejido.

Hay una serie de medios de enjuague, tales como el primer y el segundo medio, y tampones que pueden utilizarse en la presente invención. En particular, puede usarse cualquier medio o tampón de enjuague que mantenga los colágenos y los factores unidos (*por ejemplo*, componentes de la matriz, factores de crecimiento y citocinas) en un estado insoluble. Cuando se elige un medio o tampón, la concentración de sal, el pH y la fuerza iónica deben ser adecuados para mantener los colágenos y/o la mayoría o muchos de los componentes de la matriz unidos al colágeno y otros factores (*por ejemplo*, en virtud de sus conexiones químicas directas o indirectas con los colágenos) en un estado insoluble. La **Tabla 1** proporciona intervalos de concentración molar de cloruro de sodio para diversos tipos de colágeno para ayudar al experto en la técnica a proporcionar medios y tampones que garanticen que los colágenos, los componentes de la matriz asociados al colágeno y los factores de crecimiento y citocinas unidos a la matriz permanezcan insolubles. Deyl y otros ("Preparative procedures and purity assessment of collagen proteins" Journal of Chromatography B 790 (2003) 245-275) proporcionan, además, información sobre la composición química de colágeno que puede facilitar la identificación de las condiciones óptimas para mantener los colágenos y los factores unidos en un estado insoluble y se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad.

La **Tabla 1** demuestra que el pH es una variable que funciona junto con la concentración de sal para definir la solubilidad. Al tener altas concentraciones de sal, el pH puede ser neutro. En algunas modalidades de la presente invención, la concentración de sal elegida es una que mantiene todos los colágenos del tejido en un estado insoluble, no solo uno de los colágenos del tejido en un estado insoluble. Por ejemplo, los colágenos conocidos en hígado fetal son aquellos insolubles en concentraciones de sal de aproximadamente 4,5 M de NaCl y los que en tejido hepático adulto son insolubles en concentraciones de sal de aproximadamente 3,4 M-3,5 M de NaCl.

La osmolalidad de cualquiera de los medios y/o tampones de enjuague puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 200 mOsm/kg a aproximadamente 400 mOsm/kg, de aproximadamente 250 mOsm/kg a aproximadamente 350 mOsm/kg, de aproximadamente 275 mOsm/kg a aproximadamente 325 mOsm/kg o de aproximadamente 300 mOsm/kg a aproximadamente 325 mOsm/kg, que incluye, sin limitación, cualquier valor dentro de estos intervalos que no se mencione explícitamente en la presente descripción. El agua destilada y los tampones diluidos (por ejemplo, con osmolalidad < 100 mOsm/kg) darán lugar a la pérdida de cantidades significativas de colágeno, componentes de la matriz asociados al colágeno y factores de crecimiento y citocinas unidos a la matriz. Por lo tanto, en algunas modalidades de los métodos de esta invención, no se incluyen agua destilada y tampones diluidos.

Como un experto en la técnica reconocería, la osmolalidad es una expresión de concentración osmótica de soluto por masa, mientras que la osmolaridad es por volumen de solvente. Por lo tanto, la conversión de osmolaridad a osmolalidad puede realizarse mediante multiplicación por la densidad en masa. La osmolalidad puede medirse con el uso de un osmómetro que mide las propiedades coligativas, tales como la depresión del punto de congelación, la presión de vapor y la elevación del punto de ebullición.

La osmolaridad es la medida de la concentración de soluto, definida como el número de osmoles (Osm) de soluto por litro (l) de solución (osmol/l u Osm/l). La osmolaridad de una solución se expresa usualmente como Osm/l. Mientras la molaridad mide el número de moles de soluto por unidad de volumen de solución, la osmolaridad mide el número de osmoles de partículas de soluto por unidad de volumen de solución. La osmolalidad es una medida de los osmoles de soluto por kilogramo de solvente (osmol/kg o Osm/kg).

La molaridad y la osmolaridad no se usan comúnmente en la osmometría porque dependen de la temperatura. Esto se debe a que el agua cambia su volumen con la temperatura. Sin embargo, si la concentración de solutos es muy baja, la osmolaridad y la osmolalidad se consideran equivalentes.

- 5 La osmolaridad de una solución puede calcularse a partir de la siguiente expresión:

$$10 \quad \text{osmol/L} = \sum_i \varphi_i n_i C_i ,$$

15 donde φ es el coeficiente osmótico, que representa el grado de no idealidad de la solución; n es el número de partículas (por ejemplo, iones) en las que se disocia una molécula; C es la concentración molar del soluto; y el índice i representa la identidad de un soluto particular. En el caso más sencillo, φ es el grado de disociación del soluto. Entonces, φ está entre 0 y 1 donde 1 indica 100 % de disociación. Sin embargo, φ también puede ser mayor que 1 (por ejemplo, para la sacarosa). Para las sales, los efectos electrostáticos provocan que φ sea menor que 1 aunque se produzca 100 % de disociación.

20 La perfusión del tejido biológico con cualquier medio o tampón puede llevarse a cabo mediante la inyección del medio o tampón a través de la vasculatura relevante del tejido biológico. Por ejemplo, si el tejido biológico es el hígado, entonces el medio o tampón puede perfundirse a través de la vena porta del hígado. Alternativamente, el medio o tampón puede verse sobre el tejido biológico y/o se deja difundir a través del tejido biológico. Por ejemplo, el tejido biológico puede sumergirse y/o dializarse en el medio o tampón lo que permite que el medio o tampón difunda a través del tejido biológico. Mientras se sumerge y/o se dializa en el medio o tampón, la solución y el tejido biológico pueden agitarse, tal como en un balancín y/o revolverse. En algunas modalidades el medio y los tampones perfunden a través de la vasculatura relevante del tejido biológico.

25 Alternativamente, el tejido puede homogeneizarse en el medio inicial y los tampones y medios usados después de eso son para la extracción del homogeneizado. Las versiones homogeneizadas de los andamios de biomatriz se preparan a partir de órganos grandes (por ejemplo, de tejidos de vaca o cerdo), después se pulverizan en polvo a temperaturas de nitrógeno líquido y el polvo se usa en placas para estudios en cultivo.

30 En algunas modalidades el primer medio y/o el segundo medio es un medio basal, tal como pero sin limitarse a, RPMI 1640, DME/F12, DME, F12, BME, DMEM, medio de Waymouth o de William. Otros medios basales ilustrativos se conocen en la técnica y están disponibles comercialmente. El primer medio y/o el segundo medio pueden comprender, consistir esencialmente en, o consistir en componentes que se combinan para mantener insolubles la mayoría de los colágenos y como moléculas naturales, como se describe en la presente descripción (por ejemplo, por la combinación particular de osmolalidad y fuerza iónica así como la ausencia de suero). El primer medio y/o el segundo medio pueden comprender, consistir en, o consistir esencialmente en constituyentes presentes o similares o que imitan a los presentes en el líquido intersticial tales como, pero sin limitarse a, agua; sales tales como, pero sin limitarse a, sales inorgánicas; vitaminas; minerales; aminoácidos tales como, pero sin limitarse a, glicina, serina, treonina, cisteína, asparagina y/o glutamina; azúcares; ácidos grasos, coenzimas; hormonas; y neurotransmisores. En determinadas modalidades donde el primer medio y/o el segundo medio comprenden constituyentes presentes o similares o que imitan a los presentes en el líquido intersticial, los constituyentes pueden producir una osmolalidad aproximadamente equivalente a la osmolalidad del medio basal disponible comercialmente o producir una osmolalidad de aproximadamente 250 mOsm/kg a aproximadamente 350 mOsm/kg. En algunas modalidades el primer medio y/o el segundo medio incluyen medios que están libres de suero, comprenden constituyentes presentes en líquido intersticial y/o tienen una osmolalidad de aproximadamente 250 mOsm/kg a aproximadamente 350 mOsm/kg. Tales medios también pueden estar a pH neutro. La composición específica del primer medio y/o el segundo medio se determina, en modalidades particulares, por las constantes de insolubilidad de los colágenos del tejido biológico usado para preparar el andamio de biomatriz, como conoce un experto en la técnica.

35 El tampón deslipidante debería ser eficaz y no obstante suave. El tampón deslipidante puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en detergentes o tensioactivos, medio basal, sales y/o lipasas. Cuando se eligen componentes para el tampón deslipidante, se deben evitar los detergentes fuertes (por ejemplo, dodecilsulfato de sodio; Tritón X-100) para minimizar la pérdida de componentes de la matriz. Los detergentes ilustrativos de esta invención incluyen, pero no se limitan a, detergentes aniónicos, tales como sales de ácido desoxicólico, ácido 1-heptanosulfónico, N-laurilsarcosina, lauril sulfato, ácido 1-octano sulfónico y ácido taurocólico; detergentes catiónicos tales como cloruro de benzalconio, cetilpiridinio, cloruro de metilbencetonio y bromuro de decametONIO; detergentes zwitteriónicos tales como alquil betainas, alquil amidoalquil betainas, N-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato y fosfatidilcolina; y detergentes no iónicos tales como n-decil α -D-glucopiranosido, n-decil β -D-maltopiranosido, n-dodecil β -D-maltósido, n-octil β -D-glucopiranosido, ésteres de sorbitán, n-tetradecil β -D-maltósido, tritones, Nonidet-P-40, Poloxámero 188 y cualquiera de los detergentes del grupo de los Tween; lauril sulfato de sodio; y desoxicolato de sodio.

65

Las lipasas ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, fosfolipasas tales como fosfolipasa A2, lipasa pancreática humana, esfingomielinasas, lipasa lisosomal, lipasa endotelial y lipasa hepática. En los métodos de la invención, el tampón deslipidante comprende desoxicolato de sodio y fosfolipasa A2. Esta combinación, en algunas modalidades, puede comprender de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 unidades/l de fosfolipasa A2 y aproximadamente 1 % de desoxicolato de sodio preparados en un medio basal de pH neutro y libre de suero que puede ser, por ejemplo, el primer medio. La combinación de desoxicolato de sodio y fosfolipasa A2 degrada rápidamente el fosfoglicérido ubicado en la membrana citoplasmática y la membrana mitocondrial a lisolecitina, un tensioactivo poderoso, que puede inducir necrosis y citólisis. Como reconocerá un experto en la técnica, la cantidad y el tipo de lipasa y/o detergente puede depender del tejido biológico.

La etapa de perfundir el tejido biológico con el tampón deslipidante se lleva a cabo, en algunas modalidades, hasta que el tejido se vuelve transparente. En otras modalidades la etapa de perfundir el tejido biológico con el tampón deslipidante se lleva a cabo hasta que la efusión se vuelve clara. En algunas modalidades la etapa de deslipidación se lleva a cabo hasta que el tejido se vuelve transparente y la efusión se vuelve clara.

En algunas modalidades se evita la exposición prolongada de los andamios de biomatriz a enzimas de las células rotas ya que puede disminuir en gran medida el contenido de elastina y el contenido de glicosaminoglicanos tales como sulfatos de heparán, sulfatos de condroitina, sulfatos de dermatán y heparinas, que son sitios en los que se unen las citocinas y los factores de crecimiento. La exposición a las enzimas de las células rotas puede evitarse, por ejemplo, durante la deslipidación y/o los lavados posteriores después de la deslipidación. En algunas modalidades, el uso de un inhibidor de proteasas y/o un control cuidadoso del pH, la temperatura y/o el tiempo puede emplearse para limitar la actividad de las proteasas y/u otras enzimas de las células rotas.

Los inhibidores de proteasas ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de serina proteasas tales como, pero sin limitarse a, antipain, aprotinina, quimostatina, elastatinal, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), APMSF, TLCK, TPCK, leupeptina e inhibidor de tripsina de soja; cisteína proteasas tales como, pero sin limitarse a, IAA (ácido indolacético) y E-64; inhibidores de proteasa aspártica tales como, pero sin limitarse a, pepstatina y VdLPFFVdL; metaloproteasas tales como, pero sin limitarse a, EDTA, 1,10-fenantrolina y fosforamodón; exopeptidasas tales como, pero sin limitarse a, amastatina, bestatina, diprotina A y diprotina B; tiol proteasas; α -2-macroglobulina, inhibidor de tripsina de soja o de judía blanca; inhibidor de proteasa pancreática; ovostatina de clara de huevo; cistatina de clara de huevo; y combinaciones de inhibidores de proteasas, que los proveedores comerciales de tales inhibidores denominan comúnmente "cóctel de inhibición de proteasas".

El pH del andamio de biomatriz, tampones y/o medios puede mantenerse en de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 9,0, de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5, de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 8,0 o de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8,0. En algunas modalidades, el andamio de biomatriz, los tampones, y/o los medios se mantienen a un pH de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8,0 o se mantienen a un pH de aproximadamente 7,3 a aproximadamente 7,5, que incluye sin limitación, cualquier valor abarcado dentro de estos intervalos pero no mencionado explícitamente en la presente descripción. En otras modalidades el andamio de biomatriz, los tampones y/o los medios se mantienen a pH neutro. La temperatura del andamio de biomatriz (por ejemplo, durante y/o después de la preparación), los tampones y/o los medios puede ser de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 30 °C, de aproximadamente 5 °C a aproximadamente 25 °C o de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 20 °C, que incluye sin limitación, cualquier valor abarcado dentro de estos intervalos pero no mencionado explícitamente en la presente descripción. En algunas modalidades, la temperatura se mantiene a aproximadamente 20 °C. El tiempo para perfundir el tejido biológico con cualquier medio o tampón puede ser de aproximadamente 5 horas o menos, aproximadamente 3 horas o menos, aproximadamente 1 hora o menos, aproximadamente 30 minutos o menos, o aproximadamente 15 minutos o menos. En algunas modalidades la etapa de perfundir el tejido biológico con el tampón deslipidante es de aproximadamente 30 minutos o menos. En algunas modalidades donde se usan pH ácidos, las concentraciones de sal para mantener insolubles los colágenos y los componentes asociados al colágeno pueden ser diferentes; las concentraciones pueden determinarse por la bibliografía existente sobre la composición química del colágeno mediante la elección de concentraciones de sal que mantienen la insolubilidad de los colágenos.

Los tampones ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, cloruro de sodio, lactato de sodio, acetato de sodio, fosfato de sodio, citrato de sodio, borato de sodio, gluconato de sodio, tampones de citrato, tampones bis/tris, tampones de fosfato, fosfato de potasio, citrato/dextrosa, bicarbonato de sodio, cloruro de amonio, ácido 3-[[tris(hidroximetil)metil]amino]propanosulfónico, tris(hidroximetil)metilamina, N-tris(hidroximetil)metilglicina, ácido 4-2-hidroxietil-1-piperazinoetanosulfónico y ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico.

En algunas modalidades el tampón de esta invención (por ejemplo, el tampón usado en la etapa c) descrita en la presente descripción) puede comprender una sal en una concentración de aproximadamente 2,0 M o más. Por ejemplo, en algunas modalidades la sal puede estar en una concentración de aproximadamente 2,0 M a aproximadamente 5,0 M, de aproximadamente 2,5 M a aproximadamente 5,0 M, de aproximadamente 3,0 M a aproximadamente 4,5 M, o de aproximadamente 3,0 M a aproximadamente 4,0 M, que incluye sin limitación, cualquier valor abarcado dentro de estos intervalos pero no mencionado explícitamente en la presente descripción. Por ejemplo, en algunas modalidades el tampón utilizado en los métodos de la presente invención puede comprender una sal tal

como cloruro de sodio en una concentración de NaCl de aproximadamente 2,0 M a aproximadamente 4,5 M de NaCl. En otras modalidades, tales como las de hígados adultos, el tampón utilizado puede comprender de aproximadamente 3,4 M a aproximadamente 3,5 M de NaCl. En modalidades tales como las de hígado fetal, el tampón utilizado puede comprender una sal tal como cloruro de sodio en una concentración de aproximadamente 4,0 M a aproximadamente 4,50 M. En algunas modalidades, la perfusión del tejido biológico con un lavado con sal, tal como el de la etapa c) de los métodos ilustrativos descritos en la presente descripción, se lleva a cabo hasta que el perfusato (es decir, el líquido usado para la perfusión, tal como el líquido que se ha inyectado a través de la vasculatura) es negativo para proteínas por densidad óptica (OD) a 280 nm.

Cualquiera de los medios y/o tampones de la presente invención puede comprender un inhibidor de proteasas. Anteriormente se describieron inhibidores de proteasas ilustrativos. En algunas modalidades, el tampón tal como el de la etapa (c) de los métodos ilustrativos descritos en la presente descripción comprende un inhibidor de proteasas, tal como el inhibidor de tripsina de soja. En otras modalidades, el tampón de la etapa (d) comprende uno o más inhibidores de proteasas, tales como un inhibidor de tripsina de soja.

Los medios y/o tampones de la presente invención pueden comprender una o más nucleasas, que en algunas modalidades pueden prepararse en los tampones estándar recomendados por los proveedores comerciales de estas enzimas. Por ejemplo, en algunas modalidades el tampón de la etapa d) comprende una o más nucleasas, tales como pero sin limitarse a, RNasa y DNasa. La perfusión con nucleasas elimina los residuos de ácidos nucleicos. En otras modalidades, el tampón de la etapa d) comprende RNasa, DNasa, y uno o más inhibidores de proteasas. En algunas modalidades la perfusión del tejido biológico con una o más nucleasas se lleva a cabo hasta que el perfusato (es decir, el líquido usado para la perfusión, tal como el líquido que se ha inyectado a través de la vasculatura) es negativo para ácidos nucleicos por densidad óptica (OD) a 260 nm. En algunas modalidades, las nucleasas eliminan 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 100 % de los ácidos nucleicos en el tejido biológico.

El segundo medio (por ejemplo, medio de enjuague final) puede ser cualquier medio que garantice que los colágenos y los factores unidos (por ejemplo, componentes de la matriz, factores de crecimiento y citocinas) permanecerán insolubles, como se describió anteriormente. Los medios de enjuague final ilustrativos se describieron anteriormente en referencia al primer medio y están libres de suero, a pH neutro y con una osmolalidad de 250-350 mOsm/kg. Por ejemplo, en algunas modalidades el segundo medio comprende un medio basal. En algunas modalidades, el segundo medio es un medio basal libre de suero. En otras modalidades, el segundo medio es un medio libre de suero, definido hormonalmente (HDM) que comprende hormonas, factores de crecimiento, lípidos y albúmina sérica y se adapta a la necesidad de las células a cultivar. Un segundo medio ilustrativo es el medio de Kubota (Kubota y Reid, PNAS 97:12132-12137, 2000), diseñado para células madre hepáticas, hepatoblastos y otras progenitoras. En determinadas modalidades, el segundo medio puede o no comprender suplementación con suero o un factor derivado de suero, tal como pero sin limitarse a, albúmina sérica humana. En algunas modalidades, el enjuague del tejido con el segundo medio elimina los residuos del tampón deslipidante y las nucleasas. En otras modalidades el lavado con el segundo medio y/o cualquier tampón o medio posterior equilibra el andamio de biomatriz con el medio o tampón. En algunas modalidades, el primer medio y el segundo medio pueden ser iguales y en algunas modalidades, el primer medio y el segundo medio pueden ser diferentes para producir así un andamio de biomatriz a partir del tejido biológico.

En algunas modalidades, uno o más de los medios y/o tampones utilizados en la preparación del andamio de biomatriz están libres de (es decir, no contienen una cantidad detectable de) una o más enzimas que degradan los componentes de la matriz extracelular. En otras modalidades, todos los medios y tampones utilizados en la preparación del andamio de biomatriz están libres de (es decir, no contienen una cantidad detectable de) una o más enzimas que degradan los componentes de la matriz extracelular. Las enzimas ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, colagenasas; proteasas; glicosidasas tales como heparinasa, heparitinasa, condroitinasa e hialuronidasa; y elastasas.

La esterilización del tejido biológico, el homogeneizado y/o el andamio de biomatriz de esta invención puede llevarse a cabo por cualquier método conocido en la técnica, con la salvedad de que deben evitarse los métodos que usan un factor que puede unirse al andamio de biomatriz (por ejemplo, óxido de etileno). Los métodos de esterilización ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, irradiación gamma, esterilización con plasma por descarga luminiscente de radiofrecuencia (RFGD), esterilización con haz de electrones y esterilización con dióxido de carbono supercrítico. En algunas modalidades la esterilización del tejido, el homogeneizado y/o el andamio de biomatriz se lleva a cabo con radiación gamma a aproximadamente 5000 rads. Si los andamios van a usarse inmediatamente para la recelularización, y si se usaron procedimientos estériles en el proceso de descelularización (especialmente después de la extracción con alto contenido de sales), entonces puede no ser necesaria la esterilización.

El almacenamiento del andamio de biomatriz puede llevarse a cabo por cualquier método conocido en la técnica. En algunas modalidades (por ejemplo, cuando el andamio va a usarse intacto), el andamio de biomatriz puede almacenarse a aproximadamente 4 °C y en otras modalidades (por ejemplo, cuando el andamio va a dispersarse en secciones, el andamio de biomatriz se congela, por ejemplo, a aproximadamente -80 °C.

En algunas modalidades, el andamio de biomatriz comprende, consiste en, o consiste esencialmente en colágenos, fibronectinas, lamininas, nidógeno/entactina, elastina, proteoglicanos, glicosaminoglicanos y cualquier combinación de los mismos, todos son parte del andamio de biomatriz (por ejemplo, unidos al andamio de biomatriz). En algunas

modalidades, el andamio de biomatriz carece de una cantidad detectable de un colágeno, fibronectina, laminina, nidógeno/entactina, elastina, proteoglicano, glicosaminoglicano y cualquier combinación de los mismos.

Los andamios de biomatriz producidos por el método de la presente invención han demostrado ser sustratos de diferenciación potentes para las células y pueden usarse para muchos tipos de células, tales como pero sin limitarse a, cualquier célula madura o para diversas poblaciones de células madre. Estas incluyen, *por ejemplo*, células madre embrionarias (ES), células madre pluripotentes inducidas (iPS), células madre de la capa germinal (*por ejemplo*, células madre del endodermo definitivo), células madre determinadas (*por ejemplo*, células madre hepáticas, pulmonares, pancreáticas o intestinales), células madre hepáticas humanas (hHpSC), células madre perinatales (*por ejemplo*, células madre derivadas del líquido amniótico (AFSC)), células madre mesenquimales (MSC) tales como de médula ósea o de tejido adiposo, progenitoras comprometidas, células adultas de cualquier tipo de tejido, células enfermas, células tumorales, células maduras, células parenquimales, células estrelladas, colangiocitos, células del árbol biliar tales como aquellas que no son colangiocitos, hepatocitos, células renales, células uroteliales, células mesenquimales, células de músculo liso y esquelético, miocitos (células madre musculares), fibroblastos, condrocitos, adipocitos, miofibroblastos, células endoteliales, células ectodérmicas, que incluyen células ductales y de la piel, células nerviosas, células de los islotes, células presentes en el intestino, osteoblastos, otras células que forman hueso o cartílago, y cualquier combinación de las mismas. Estas células pueden ser normales o enfermas.

En algunas modalidades, los andamios de biomatriz se usan para estudios biológicos, farmacéuticos, genéticos, moleculares y/o virológicos de células, ya sean recién aisladas de tejido o de células madre de linaje restringido. En otras modalidades, los andamios de biomatriz se usan para órganos implantables y vascularizados producidos por ingeniería de tejidos, tales como pero sin limitarse a, el hígado. Otros usos ilustrativos de los andamios de biomatriz incluyen, pero no se limitan a, fabricación de proteínas, pruebas de toxicidad de fármacos, desarrollo de fármacos, tamizaje de anticuerpos y/o producción de virus para preparaciones vacunales de virus. La producción de virus de virus dependientes del linaje (*por ejemplo*, virus del papiloma y la hepatitis C) puede lograrse mediante la siembra de poblaciones de células madre en un andamio de biomatriz específico de tejido y después el cultivo en un medio que funciona en combinación con el andamio de biomatriz para inducir completamente la diferenciación de las células. Los viriones maduros se producirán cuando las células maduren completamente. Siempre que el virus en sí no afecte la viabilidad celular, las células maduras infectadas con el virus pueden mantenerse durante al menos ocho semanas lo que ofrece un medio para generar grandes cantidades de virus con un sistema de cultivo estable.

Los andamios de biomatriz pueden usarse intactos, tal como pero sin limitarse a, el uso para cultivos 2-D y/o 3-D para células. En algunas modalidades, los andamios de biomatriz pueden usarse en combinación con un medio específico para la diferenciación en cultivos 2-D y/o 3-D para líneas celulares, tales como pero sin limitarse a, células normales o enfermas de cualquier etapa del linaje de maduración desde células madre hasta células en etapa tardía.

Alternativamente, los andamios de biomatriz pueden congelarse. Estas secciones congeladas pueden prepararse y usarse como sustratos. Los andamios de biomatriz pueden congelarse rápidamente en hielo seco y se preparan secciones congeladas con un criostato, se colocan sobre aparatos de cultivo (*por ejemplo*, placas, matraces, tela, placas transwell, etcétera), se esterilizan y rehidratan en medio antes de sembrar las células. En algunas modalidades, el andamio de biomatriz congelado de esta invención puede cortarse en secciones.

En algunas modalidades, se produce un cultivo de células, que comprende: a) producir un andamio de biomatriz de acuerdo con los métodos de esta invención; b) poner en contacto el andamio de biomatriz de la etapa (a) con medio de cultivo de células en un aparato de cultivo; y c) sembrar el andamio de biomatriz de la etapa (b) con células, para producir así un cultivo de células.

En algunas modalidades, se produce un cultivo de células, que comprende: a) producir un andamio de biomatriz de la presente invención; b) congelar el andamio de biomatriz de la etapa (a); c) preparar una sección congelada del andamio de biomatriz de la etapa (b) como un sustrato de cultivo de células; d) poner en contacto el sustrato de cultivo de células de la etapa (c) con medio de cultivo de células en un aparato de cultivo; y e) sembrar el sustrato de cultivo de células de la etapa (d) con células, para producir así un cultivo de células.

En otras modalidades, los andamios de biomatriz pueden triturarse hasta un polvo. Un método para triturar el andamio de biomatriz hasta un polvo comprende triturar el andamio de biomatriz hasta un polvo en un molino congelador a temperaturas en o cerca de las temperaturas de nitrógeno líquido. Otros aparatos para triturar a temperaturas de nitrógeno líquido o equivalentes (*por ejemplo*, congelación con hielo seco) se conocen en la técnica. El polvo puede llevarse a temperatura ambiente a la cual adquiere la consistencia de una pintura que puede aplicarse sobre los aparatos de cultivo con el uso de una brocha estéril o un aparato equivalente. El polvo o las placas pueden esterilizarse.

Por lo tanto, en algunas modalidades se produce un cultivo de células que comprende: a) producir un andamio de biomatriz de la presente invención; b) triturar el andamio de biomatriz de la etapa (a) hasta un polvo; c) recubrir un aparato de cultivo con el polvo de la etapa (b) para producir un sustrato de cultivo de células; d) poner en contacto el sustrato de cultivo de células de (c) con medio de cultivo en el aparato de cultivo; y e) sembrar el sustrato de cultivo de células de (d) con células, para producir así un cultivo de células. En algunas modalidades de este método, la

trituration de la biomatriz puede llevarse a cabo en un molino congelador (por ejemplo, trituration criogénica) en o cerca de la temperatura del nitrógeno líquido.

En algunas modalidades, antes de sembrar las células para el cultivo de células, se añade una porción del medio al aparato de cultivo ya que las células pueden adherirse en segundos. Las células, en algunas modalidades se adhieren en segundos a minutos para células adultas normales y en minutos a unas pocas horas para diversos tipos de células madre. En algunas modalidades, la adhesión de las células puede depender de cómo se dispersan los andamios de biomatriz para el uso en cultivos. El medio celular puede ser cualquier medio que sea adecuado para producir un cultivo de células. En algunas modalidades el medio de cultivo de células comprende al menos un constituyente presente en el líquido intersticial, en donde la osmolalidad de dicho medio es de aproximadamente 250 mOsm/kg a aproximadamente 350 mOsm/kg, en donde dicho medio está libre de suero y en donde el pH es neutro. En otras modalidades, el medio de cultivo de células puede ser un medio basal, tal como pero sin limitarse a, RPMI-1640, DME/F12, medio de Ham, medio de Kubota, etcétera.

Los cultivos de células producidos con los andamios de biomatriz, en algunas modalidades, comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en el mismo tipo de células que las células del tejido biológico que se usó para preparar el andamio de biomatriz. Los ejemplos no limitantes de las células de esta invención incluyen células madre embrionarias (ES), células madre pluripotentes inducidas (iPS), células madre determinadas, células madre perinatales, células madre derivadas del líquido amniótico (AFSC), células madre mesenquimales (MSC) de cualquier fuente, progenitoras comprometidas o células adultas de cualquier tipo de tejido, células maduras, células normales, células enfermas, células tumorales y cualquier combinación de las mismas. Los ejemplos no limitantes adicionales incluyen células hepáticas, células parenquimales, células estrelladas, células endoteliales, hepatocitos, colangiocitos, células del árbol biliar que no son colangiocitos y células pancreáticas.

En algunas modalidades, las células madre primitivas (ya sean ES, iPS, MSC o AFSC) restringirán el linaje de las células, al menos parcialmente, al tipo de tejido usado para preparar el andamio de biomatriz. Las células madre determinadas de una capa germinal dada restringirán el linaje al tipo de tejido usado para preparar el andamio de biomatriz cuando el andamio se prepara a partir de un tejido derivado de esa capa germinal y pueden diferenciarse parcialmente al destino adulto si están en un andamio de un tejido derivado de una capa germinal diferente. Por lo tanto, la capacidad de las células adultas de diferenciarse completamente puede encontrarse determinada por el tipo de tejido del andamio de biomatriz. En paralelo, el destino de las células madre puede encontrarse determinado de manera parcial o completa por el tipo de tejido del andamio de biomatriz o el destino de las células madre puede encontrarse determinado completamente por el tipo de tejido del andamio de biomatriz. En algunas modalidades, las células del cultivo de células son de un tipo diferente que las células del tejido biológico usado para preparar el andamio de biomatriz. Como se describió en detalle anteriormente, los tipos ilustrativos de células que pueden usarse en la producción de un cultivo de células incluyen, pero no se limitan a, células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas, células madre mesenquimales, células madre derivadas del líquido amniótico, células madre determinadas, células maduras, células normales, células enfermas, células tumorales y cualquier combinación de las mismas. Estas células pueden ser de cualquier tejido biológico como se describe en la presente descripción.

En algunas modalidades, los andamios de biomatriz inducen un crecimiento lento o detención del crecimiento correlacionado con la diferenciación de las células normales, ya sean células madre o células maduras. Las células maduras, en algunas modalidades, se diferencian completamente en horas y permanecen diferenciadas de manera estable durante al menos ocho semanas después de eso. En algunas modalidades, las células adultas (*es decir*, células completamente maduras) se adhieren a los andamios en minutos y retienen su diferenciación completa después de eso durante más de ocho semanas. Las células madre, en algunas modalidades, experimentan algunas divisiones y después pasan a la detención del crecimiento y se diferencian completamente. Las células madre permanecen de manera estable en la detención del crecimiento, viables y completamente diferenciadas durante al menos ocho semanas. En algunas modalidades, las células madre sembradas sobre andamios de biomatriz pasan a la detención del crecimiento o disminuyen su crecimiento, pierden los marcadores de células madre y se diferencian a células maduras funcionales en aproximadamente una semana, con retención de fenotipos y viabilidades estables durante al menos ocho semanas o más (por ejemplo, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % de viabilidad durante un período de tiempo prolongado (por ejemplo, al menos una semana, al menos dos semanas, al menos tres semanas, al menos cuatro semanas, al menos cinco semanas, al menos seis semanas, al menos siete semanas, al menos ocho semanas, al menos nueve semanas, al menos diez semanas, al menos 11 semanas, al menos 12 semanas, al menos 13 semanas, al menos 14 semanas, al menos 15 semanas, al menos 16 semanas, al menos un mes, al menos dos meses, al menos tres meses, al menos cuatro meses, al menos cinco meses, al menos seis meses, al menos siete meses, al menos ocho meses, al menos nueve meses, al menos diez meses, al menos 11 meses, al menos un año, etcétera).

El andamio de biomatriz puede usarse para diferenciar células madre embrionarias (ES) y/o inducir células madre pluripotentes (IPS) a un destino específico. Por ejemplo, en algunas modalidades un andamio de biomatriz específico de tejido se usa para facilitar que las células madre embrionarias en diferenciación o las células pluripotentes inducidas sigan un destino específico.

El andamio de biomatriz puede usarse para diferenciar células madre derivadas del líquido amniótico (AFSC) o células madre mesenquimales (MSC) de médula ósea o de tejido adiposo o de cualquier tejido fetal o postnatal o cualquier célula madre determinada (por ejemplo, de pulmón, intestino, árbol biliar, riñón, piel, corazón, etcétera) hacia un destino adulto específico. En algunas modalidades los andamios de biomatriz de la presente invención se usan para aumentar y acelerar la diferenciación de células madre a células maduras mediante la producción de un cultivo de células.

En la presente descripción se describe un método para aumentar y/o acelerar la diferenciación de células madre y/o progenitoras a células maduras, que comprende producir un cultivo de células de acuerdo con los métodos de esta invención, en donde las células son células madre y el medio de cultivo de células se formula para células maduras, para aumentar y/o acelerar así la diferenciación de células madre y/o progenitoras a células maduras. El medio de cultivo de células puede ser cualquier medio que se formula para células maduras. Los constituyentes en el medio son distintos para cada tipo de célula. Diferenciación significa que las condiciones provocan que las células maduren a tipos de células adultas que producen productos génicos específicos de adultas. Las células empleadas en estos métodos pueden ser células adultas de cualquier tipo o células madre o progenitoras, cuyos ejemplos no limitantes incluyen células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas, células madre de capas germinales, células madre determinadas, células madre perinatales, células madre derivadas del líquido amniótico, células madre mesenquimales, células amplificadoras transitorias o progenitoras comprometidas de cualquier tipo de tejido.

Las células sembradas sobre los andamios de biomatriz (*por ejemplo*, andamios de biomatriz intactos, secciones de andamios o andamios de biomatriz en polvo mezclados en/sobre otros materiales implantables) pueden trasplantarse a animales o seres humanos como un método para injertar células *in vivo*. En algunas modalidades se proporciona un método para suministrar células a un sujeto que comprende poner en contacto el sujeto con el andamio de biomatriz de la presente invención, donde el andamio de biomatriz comprende células. En otras modalidades se proporciona un método para suministrar células a un sujeto que comprende sembrar el andamio de biomatriz de la presente invención con células y después trasplantar el andamio de biomatriz sembrado con las células al sujeto. En algunas modalidades, un andamio de biomatriz que no se ha sembrado con ninguna célula puede trasplantarse a un sujeto.

En algunas modalidades, el andamio de biomatriz puede usarse como un injerto que puede usarse para regenerar el tejido u órgano en el sujeto.

Los andamios de biomatriz producidos por el método de la presente invención pueden usarse para establecer órganos bioartificiales, que pueden ser útiles para programas analíticos y/o clínicos. Los andamios de biomatriz pueden usarse, además, para identificar productos génicos específicos o facetas de estados patológicos. En algunas modalidades los andamios de biomatriz se preparan a partir de tejidos de animales mutantes y posteriormente se usan para definir factor(es) relevante(s) asociado(s) con la(s) mutación(ones). En otras modalidades los andamios de biomatriz se preparan a partir de tejidos enfermos y se usan para definir cambios en la matriz relevantes para la enfermedad.

Los ejemplos no limitantes adicionales de usos de los andamios de biomatriz de esta invención incluyen: 1) el uso del andamio para cultivar células malignas para definir el potencial metastásico (la capacidad de las células tumorales de formar colonias de células en crecimiento en un tipo dado de andamio de biomatriz predice la capacidad de las células de hacer metástasis al tejido a partir del cual se preparó el andamio); 2) la colocación de injertos de tejido en el andamio a usar para el trasplante a un sujeto); 3) la producción de organoides formados por recellularización de andamios a usar como dispositivos auxiliares, tales como, por ejemplo, un organoide hepático que después se conecta a un sujeto con insuficiencia hepática; 4) el uso del andamio para la fabricación de proteínas (las células en el andamio producen un factor que puede aislarse del medio y/o de las células y después purificarse; y 5) el uso del andamio para la producción de virus dependientes del linaje, por ejemplo, para la producción de virus que requieren células diferenciadas para producir partículas virales suficientes para el uso como una vacuna.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para identificar el potencial metastásico de células tumorales en un tipo de tejido, que comprende a) producir un andamio de biomatriz de acuerdo con los métodos de esta invención; b) poner en contacto el andamio de biomatriz de (a) con un medio de cultivo de células en un aparato de cultivo; c) sembrar el andamio de biomatriz de (b) con células tumorales; d) mantener el andamio de biomatriz de (c) en condiciones de cultivo; y e) supervisar el crecimiento de las células tumorales en el andamio de matriz de (d), en donde el crecimiento de células tumorales en el andamio de biomatriz identifica que las células tumorales pueden colonizar *in vivo* el tipo de tejido a partir del cual se produjo el andamio de biomatriz, para identificar así el potencial metastásico de las células tumorales en el tipo de tejido.

En la presente descripción también se proporciona un método para identificar una célula tumoral como sensible a un tratamiento antitumoral, que comprende: a) producir un andamio de biomatriz de acuerdo con los métodos de esta invención; b) poner en contacto el andamio de biomatriz de (a) con medio de cultivo de células en un aparato de cultivo; c) sembrar el andamio de biomatriz de (b) con células tumorales; d) mantener el andamio de biomatriz de (c) en condiciones de cultivo; e) aplicar el tratamiento antitumoral a las células tumorales en el andamio de biomatriz; y f) supervisar el crecimiento de las células tumorales en el andamio de matriz de (e), en donde la ausencia de crecimiento de células tumorales y/o la muerte de células tumorales en el andamio de biomatriz de (e) identifica las células tumorales como sensibles al tratamiento antitumoral. Los ejemplos no limitantes de tratamiento antitumoral incluyen

agentes quimioterapéuticos, anticuerpos, terapia de radiación, inmunoterapia, terapia hormonal, etcétera, como bien se conoce en la técnica. En algunas modalidades, las células tumorales de un sujeto pueden sembrarse sobre diferentes andamios de biomatriz de esta invención y exponerse a tratamientos antitumorales respectivos. De acuerdo con los resultados de estos análisis respectivos de diferentes tratamientos antitumorales, puede seleccionarse un tratamiento antitumoral que es eficaz contra las células tumorales del sujeto y ese tratamiento antitumoral puede administrarse al sujeto para tratar el tumor del sujeto.

En modalidades adicionales, la presente invención proporciona un método para producir un injerto tumoral para el trasplante en un animal huésped, que comprende: a) producir un andamio de biomatriz de acuerdo con los métodos de esta invención; b) poner en contacto el andamio de biomatriz de (a) con medio de cultivo de células en un aparato de cultivo; c) sembrar el andamio de biomatriz de (b) con células tumorales; d) mantener el andamio de biomatriz de (c) en condiciones de cultivo; y e) establecer una población de las células tumorales en el andamio de biomatriz de (d), para producir así un injerto tumoral para el trasplante en el animal huésped. En algunas modalidades, este método puede comprender, además, la etapa de trasplantar el injerto tumoral en el animal huésped. En diversas modalidades, el injerto tumoral puede ser singénico, alogénico o xenogénico al animal huésped.

En la presente descripción también se proporciona un método para producir partículas virales de un virus dependiente del linaje, que comprende: a) producir un andamio de biomatriz de acuerdo con los métodos de esta invención; b) poner en contacto el andamio de biomatriz de (a) con medio de cultivo de células en un aparato de cultivo; c) sembrar el andamio de biomatriz de (b) con células de un tipo y etapa de linaje que pueden infectarse con el virus dependiente del linaje; d) infectar las células de (c) con el virus dependiente del linaje; e) mantener las células infectadas en el andamio de biomatriz en condiciones de cultivo; y f) recolectar las partículas virales producidas en las células infectadas, para producir así partículas virales del virus dependiente del linaje.

Los ejemplos no limitantes de un virus dependiente del linaje de esta invención incluyen virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis B, norovirus virus del papiloma humano y cualquier otro virus conocido en la actualidad o que se identifique más adelante como dependiente del linaje. Por dependiente del linaje se entiende que la célula en la que está presente el virus debe madurar o diferenciarse a una etapa particular antes de que el virus pueda replicarse exitosamente en la célula y producir partículas virales, como se conoce en la técnica.

Además, la presente invención proporciona un método para producir un organoide formado por recelularización de un andamio de biomatriz, que comprende: a) producir un andamio de biomatriz de acuerdo con los métodos de esta invención; b) poner en contacto el andamio de biomatriz de (a) con medio de cultivo de células en un aparato de cultivo; c) sembrar el andamio de biomatriz de (b) con células del mismo tipo de tejido que el tejido biológico usado para preparar el andamio de biomatriz; y d) mantener las células en el andamio de biomatriz en condiciones de cultivo, mediante lo cual se forman organoides a partir de las células, para producir así un organoide formado por recelularización del andamio de biomatriz. Este método puede comprender, además, la etapa de poner en contacto el organoide producido en las etapas (a) a la (d) con un sujeto, para el uso como un dispositivo auxiliar, como se conoce en la técnica. En este método puede usarse cualquier tipo de célula que pueda usarse para producir el andamio de biomatriz de esta invención. En algunas modalidades, las células son células hepáticas.

La presente invención proporciona, además, un método para producir una proteína de interés en células cultivadas en un andamio de biomatriz, que comprende: a) producir un andamio de biomatriz de acuerdo con los métodos de esta invención; b) poner en contacto el andamio de biomatriz de (a) con medio de cultivo de células en un aparato de cultivo; c) sembrar el andamio de biomatriz de (b) con células que producen la proteína de interés; d) mantener las células de (c) en el andamio de biomatriz en condiciones de cultivo; y e) recolectar la proteína de interés producida por las células de (d), para producir así una proteína de interés en células cultivadas en un andamio de biomatriz. Este método puede comprender la etapa adicional de purificar la proteína de interés recolectada en la etapa (f). La proteína de interés de esta invención puede ser cualquier proteína producida por una célula, ya sea de un gen endógeno y/o como una proteína recombinante, en una cantidad que puede recolectarse de las células en cultivo y/o del medio de cultivo. Numerosos ejemplos de tales proteínas de interés se conocen en la técnica.

La presente invención se explica en mayor detalle en los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1. LA RESTRICCIÓN DEL LINAJE DE CÉLULAS MADRE HEPÁTICAS HUMANAS A LOS DESTINOS MADUROS SE HACE EFICIENTE POR ANDAMIOS DE BIOMATRIZ ESPECÍFICOS DE TEJIDOS.

Resumen. Los protocolos actuales para la diferenciación de células madre hacen uso de múltiples tratamientos de señales solubles y/o factores de la matriz y típicamente dan lugar a una diferenciación parcial a células maduras con un subexpresión o sobreexpresión de genes específicos de tejidos adultos. En la presente invención, se desarrolló una estrategia para la diferenciación rápida y eficiente de células madre con el uso de sustratos de andamios de biomatriz, extractos específicos de tejido enriquecidos en matriz extracelular y factores de crecimiento y citocinas asociados, en combinación con un medio libre de suero, definido hormonalmente (HDM) adaptado para el tipo de célula adulta de interés. Los estudios descritos en la presente descripción demuestran la eficacia de los andamios de

biomatriz de esta invención en la diferenciación de células madre hepáticas humanas (hHpSC) a destinos maduros y en el mantenimiento de células parenquimales maduras como completamente funcionales durante largos períodos de tiempo. Los andamios de biomatriz se prepararon mediante un novedoso protocolo de descelularización por perfusión en cuatro etapas con el uso de condiciones diseñadas para mantener todos los tipos de colágeno insolubles. Los andamios mantuvieron la histología natural, vasculaturas permeables y aproximadamente 1 % de las proteínas tisulares pero > 95 % de sus colágenos, la mayoría de los componentes de la matriz asociados al colágeno del tejido y niveles fisiológicos de factores de crecimiento y citocinas unidos a la matriz. Los colágenos aumentaron desde niveles casi indetectables hasta >15 % de las proteínas del andamio con el resto que incluye lamininas, fibronectinas, elastina, nidógeno/entactina, proteoglicanos, y citocinas y factores de crecimiento unidos a la matriz en patrones que se correlacionan con la histología. Las células madre hepáticas humanas (hHpSC), sembradas en andamios de biomatriz de hígado y en un HDM adaptado para células hepáticas adultas, perdieron los marcadores de células madre y se diferenciaron a células parenquimales maduras funcionales en aproximadamente una semana, que permanecieron viables y con fenotipos de células maduras estables durante más de ocho semanas. Por lo tanto, los andamios de biomatriz de esta invención pueden usarse para estudios biológicos y farmacéuticos de células madre de linaje restringido, para el mantenimiento de células maduras y para tejidos u órganos implantables y vascularizados producidos por ingeniería de tejidos.

Procedimientos de descelularización. Después de la anestesia con ketamina-xilazina, se abrió la cavidad abdominal de la rata y se insertó una manga con una cánula en la vena porta para perfundir todo el hígado. (1) La perfusión se realiza con RPMI 1640 durante 10 minutos; seguido de (2) deslipidación con una lipasa (por ejemplo, 20-50 unidades de fosfolipasa A2--PLA2) combinada con un detergente suave tal como desoxicolato de sodio (SDC) al 1 % durante aproximadamente 30-60 min hasta que el tejido se vuelve transparente y la efusión se vuelve clara, (3) se realiza la perfusión con lavados con alto contenido de sal (para hígados fetales: 4,5 M de NaCl y para hígados adultos 3,4 M-3,5 M de NaCl) hasta que el perfusato es negativo para proteínas por densidad óptica (OD) a 280 nm; (4) perfusión con nucleasas (DNasa, RNasa) en RPMI 1640 hasta que el perfusato es negativo para ácidos nucleicos por OD 260; y (5) enjuague final con RPMI 1640 durante 2 horas o más.

Los andamios de biomatriz se congelan rápidamente en hielo seco y se preparan secciones congeladas con un criostato, se colocan en placas de cultivo de células de 24 pocillos, se esterilizan por irradiación gamma (5000 rads) y se rehidratan en medio (KM) durante 30 min antes de sembrar las células. Las secciones de andamios de biomatriz cubrieron -95 % de la superficie de los pocillos en la placa de 24 pocillos.

Un método alternativo para distribuir los andamios de biomatriz sobre las placas de cultivo consistió en pulverizarlos hasta un polvo con el uso de un molino congelador lleno con nitrógeno líquido. El polvo pulverizado, cuando se lleva a temperatura ambiente, adquiere la consistencia de la pintura, y puede recubrirse sobre cualquier superficie, tal como placas, portaobjetos, tela, filtros u otras superficies usadas para adherir células y/o cultivo de células. La pulverización de los andamios elimina los gradientes de los componentes de la matriz y las señales, pero la mezcla de componentes presentes aún induce efectos de diferenciación potentes. Los andamios también pueden usarse intactos y volver a sembrarse con células en la preparación de órganos producidos por ingeniería de tejidos para el trasplante *in vivo* o para cultivos 3-D.

Se desarrollaron métodos alternativos para el uso con hígados porcinos y bovinos. Los hígados porcinos y bovinos se obtuvieron de una instalación de procesamiento de carne (CT) certificada por el USDA. Ver el Ejemplo 3 para un resumen de un protocolo representativo. Cada hígado fue inspeccionado por el USDA y recibió el sello del USDA antes de salir de la instalación. Los hígados se transportaron en medio ESP-Gro (Gigacyte, Branford, CT; # de catálogo 1101-250). Los hígados recibidos en el laboratorio se pesaron, se documentaron fotográficamente y se prepararon para la perfusión. Después de la trituración, la mezcla se descongeló y se diluyó a una relación medio:biomatriz de 1:48. Esta suspensión de biomatriz se usó después para recubrir placas. Después del secado, la biomatriz se lavó tres veces y después se aplicaron las células. Las células hepáticas adultas se adhirieron en 10 minutos a las placas. Las madres/progenitoras pueden demorar más tiempo (algunas horas). Sin embargo, tanto para madres/progenitoras como para células hepáticas adultas, esencialmente 100 % de las células viables se adhieren.

Medios y soluciones. Todos los medios se esterilizaron por filtración (filtro de 0,22 µm) y se mantuvieron en la oscuridad a 4 °C antes del uso. Para mantener los colágenos estables en la biomatriz, el pH del medio de perfusión para la preparación de andamios de biomatriz se mantuvo a 7,5-8,0. Se usó RPMI-1640 (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA) como el medio basal para la preparación de andamios de biomatriz y para cultivos de hepatocitos o de células madre hepáticas. Todos los reactivos excepto los señalados se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO).

Medios de perfusión para la preparación de andamios de biomatriz.

- (1). Lavado de perfusión y enjuague de perfusión: medio basal libre de suero (por ejemplo, RPMI-1640);
- (2). Perfusión con detergente: 36 unidades/l de PLA2 más SDC al 1 %;
- (3). Perfusión con alto contenido de sal: 3,4 M de NaCl con inhibidor de tripsina de soja a 0,1 mg/ml;

(4). Perfusión con nucleasas: RNasa 5 mg/100 ml, DNasa 1 mg/100 ml e inhibidor de tripsina de soja a 0,1 mg/ml (por ejemplo, preparado en RPMI 1640).

Medio de Kubota. El KM se diseñó originalmente para hepatoblastos⁴⁷ y en la actualidad se ha descubierto su eficacia para progenitoras hepáticas humanas⁴⁸ y para otras progenitoras endodérmicas que incluyen las del árbol biliar (Wang y otros "Multipotent stem/progenitor cells in human biliary tree give rise to hepatocytes, cholangiocytes and pancreatic islets" Hepatology, 2011, en prensa) y páncreas (Wang, Y Reid L, datos no publicados). Consiste en cualquier medio basal (que aquí es RPMI 1640) sin cobre, bajo en calcio (0,3 mM), 10^{-9} M de selenio, BSA al 0,1 %, 4,5 mM de nicotinamida, 0,1 nM de sulfato de zinc heptahidratado (de Specpure, Johnson Matthew Chemicals, Royston, Inglaterra), 10^{-8} M de hidrocortisona, transferrina/Fe 5 µg/ml, insulina 5 µg/ml, lipoproteína de alta densidad 10 µg/ml y una mezcla de ácidos grasos libres que se añade unida a albúmina sérica humana purificada.

Para diferenciar las células a un destino adulto, puede usarse un medio libre de suero definido hormonalmente (HDM) adaptado al tipo de célula adulta deseado. Por ejemplo, se usó un HDM para el destino hepático adulto que consiste en KM suplementado además con calcio para lograr una concentración de 0,6 mM, 10^{-12} M de cobre, 1 nM de triyodotironina (T3), glucagón 7 ng/ml, FGF 20 ng/ml, galactosa 2 g/l, oncostatina M (OSM) 10 ng/ml, factor de crecimiento epidérmico (EGF) 10 ng/ml, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) 20 ng/ml y 10^{-8} M de hidrocortisona.

Las células se sembraron en este HDM libre de suero si se sembraron en los andamios; en circunstancias en las que se usaron enzimas para el procesamiento de células o tejidos, después el HDM se suplementó con FBS al 5 % (HyClone, Waltham, MA) durante algunas horas y se cambió a HDM libre de suero después de eso. En los experimentos de control paralelos, los cultivos se mantuvieron en el HDM con FBS al 5 %, pero se descubrió que la presencia de suero provocaba que las células perdieran las funciones diferenciadas con el tiempo. Los requisitos de factores solubles son menores que los normales para los cultivos en otros sustratos dado que muchos de los factores están unidos a los andamios de biomatriz. Los requisitos de factores solubles son menores que los normales para los cultivos en otros sustratos dado que muchos de los factores están unidos a los andamios de biomatriz.

Caracterización de árboles vasculares intactos en los andamios de biomatriz de hígado. Las ramificaciones y los restos de matriz en ramificación de la vasculatura que incluyen la red de capilares en el andamio de biomatriz de hígado de rata se han visualizado por microscopía óptica y de fluorescencia, respectivamente. Partículas de dextrano de 250 kDa etiquetadas con rodamina se inyectaron al andamio de biomatriz de hígado a través del resto de la vena porta para comprobar la integridad de los restos de matriz del sistema vascular en los andamios de biomatriz. Se preparó una película con el uso de un microscopio de disección de fluorescencia Leica MZ16FA (motorizado).

Procesamiento del hígado fetal humano. Los tejidos hepáticos fetales fueron proporcionados por una agencia acreditada (Advanced Biological Resources, San Francisco, CA) a partir de fetos entre 16-20 semanas de edad gestacional obtenidos por interrupciones de embarazo electivas. El protocolo de investigación fue revisado y aprobado por la Junta de Revisión Institucional para Estudios de Investigación en Seres Humanos en la Universidad de Carolina del Norte en Chapel Hill. Las suspensiones de células hepáticas humanas fetales se prepararon como se describió anteriormente^{48,49}. Brevemente, el procesamiento se realizó en RPMI 1640 suplementado con albúmina sérica bovina al 0,1 %, 1 nM de selenio y antibióticos. El tampón de procesamiento enzimático contenía collagenasa tipo IV a 300 U/ml y desoxirribonucleasa a 0,3 mg/ml a 32 °C con agitación frecuente durante 15-20 min. Las suspensiones enriquecidas se pensaron a través de una malla de calibre 75 y se centrifugaron a 1200 RPM durante 5 min antes de la resuspensión. La viabilidad celular calculada por exclusión con azul de tripán fue sistemáticamente mayor que 95 %.

Enriquecimiento de hHpSC y cultivo en andamios de biomatriz. Se usaron dos métodos para la purificación o enriquecimiento de hHpSC:

1) Selección en cultivo. Aproximadamente 3×10^5 células se sembraron en una placa de cultivo de tejidos de 10 cm y en KM. El medio se cambió cada 3 días. Las colonias se formaron en 5-7 días y se observaron hasta 3 meses. Las colonias se escogieron manualmente después de 14-18 días con el uso de un microscopio invertido (1X-FLAIII; Olympus, Japón y Melville, NY).

2) La inmunoselección magnética de subpoblaciones de progenitoras hepáticas multipotentes (hHpSC y hHB) se logró mediante la selección de células positivas para la molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM, CD326) con el uso de tecnologías de inmunoselección con microesferas magnéticas con el sistema MACS de Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Alemania) según las instrucciones del fabricante⁵⁰. Brevemente, las células disociadas se incubaron con anticuerpo contra EpCAM unido a microesferas magnéticas durante 30 min a 4 °C y se separaron con el uso de un sistema de separación por columna magnética de Miltenyi según los procedimientos recomendados por el fabricante.

Los cultivos se sembraron con 250 colonias de hHpSC, o 5×10^5 hHpSC enriquecidas o $2,5 \times 10^5$ hepatocitos adultos primarios. El medio se reemplazó diariamente y el medio recolectado se almacenó a -20 °C para el análisis posterior. Las células cultivadas en placas de 24 pocillos recubiertas con colágeno tipo I sirvieron como control.

Aislamiento de hepatocitos de rata adultos. Las suspensiones recién aisladas de hepatocitos de rata se obtuvieron a partir de ratas Lewis machos adultos de 3 meses de edad (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) que pesan 200-250 g. Se usó un método de perfusión en dos etapas mejorado como se describió anteriormente⁴⁹ para el aislamiento y purificación de los hepatocitos de rata. El hígado se perfundió durante 10-15 minutos con un tampón libre de calcio que contenía EGTA y después colagenasa en un tampón que contiene calcio durante 10-15 minutos. Después el hígado se disoció mecánicamente presionando el hígado digerido a través de estopilla y después por filtración secuencial de la suspensión de células a través de tamices de tamaño de malla decreciente. Las células se lavaron dos veces y después se sedimentaron a 50 g. La viabilidad se definió mediante el recuento de las células después de la tinción con azul de tripán. De manera sistemática, se aislaron 200-300 millones de células por rata con una viabilidad de 89-96 % y una pureza >99 %.

Aislamiento y cultivo de células hepáticas adultas humanas. Las suspensiones de células hepáticas humanas frescas se obtuvieron de CellzDirect (en la actualidad una parte de Invitrogen, RTP, NC). Las suspensiones se procesaron por métodos de CellzDirect, después se resuspendieron en medio HeptoMAIN (# de catálogo 1103-250; GigaCyte, Branford, CT) se sembraron a $1,88 \times 10^5$ células/cm² en placas de múltiples pocillos recubiertas con andamios de biomatriz de hígado o sobre colágeno tipo I (1 µg/ml; Meridian # de catálogo A33704H).

Análisis de la composición química de colágeno. La cantidad de colágeno en los andamios de biomatriz se evaluó en base al contenido de hidroxiprolina (hyp). Las muestras de hígados completos y de andamios de biomatriz se pulverizaron, se lavaron y se liofilizaron. Después, las alícuotas se hidrolizaron y se sometieron a análisis de aminoácidos⁵¹, y el contenido de colágeno por proteína total se calculó en base al valor de hyp de 300 residuos/colágeno.

Análisis cuantitativo del contenido de ADN y ARN. Para evaluar el ADN total restante en la biomatriz de hígado descelularizada, el tejido hepático de rata fresco y la biomatriz descelularizada se pesaron, se cortaron y digirieron con Proteinasa K y se aisló el ADN celular total⁵². Para evaluar el ARN total restante en la biomatriz de hígado descelularizada, el tejido hepático de rata fresco y la biomatriz de hígado de rata descelularizada se pesaron y después se homogeneizaron en solución de TRIzol (Invitrogen), y se aisló el ARN celular total.

Ensayos de factores de crecimiento. Las muestras de hígado de rata, andamios de biomatriz de hígado de rata, tejido de conducto biliar humano y andamios de biomatriz de conducto biliar humano (dos muestras cada uno) se enviaron a RayBiotech, Inc (Norcross, Georgia) para el análisis de los factores de crecimiento. Las muestras se homogeneizaron, se prepararon como lisados, y después se analizaron con 1 mg/ml de proteína, lo que produjo fluorescencia, definida en unidades de intensidad de fluorescencia (FIU). Los ensayos semicuantitativos de factores de crecimiento se realizaron con el uso de matrices de factores de crecimiento humanos RayBio®, G Serie 1. Las FIU se redujeron por las de los controles negativos para la unión no específica y se normalizaron con respecto a la concentración de proteínas. Los datos de los duplicados se promediaron. Se usaron cuatro matrices lo que permitió el estudio de ~40 factores de crecimiento. Aunque el ensayo se desarrolló para factores de crecimiento humanos, existe suficiente superposición en la reacción cruzada con factores de crecimiento de rata para permitir el uso tanto para muestras de rata como humanas.

Microscopía electrónica de transmisión y de barrido (TEM y SEM). Para la TEM, los andamios de biomatriz se enjuagaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se fijaron en glutaraldehído al 3 %/cacodilato de sodio 0,1, pH 7,4 durante toda la noche. Después de tres enjuagues con tampón de cacodilato de sodio, los andamios de biomatriz se fijaron durante 1 hora en tetróxido de osmio al 1 %/tampón de cacodilato de sodio 0,1. Después del enjuague en agua desionizada, se deshidrató y se incrustó en resina epoxi Polybed 812 (Polysciences, Niles, IL). Los andamios de biomatriz se cortaron en secciones perpendiculares al sustrato a 70 nm con el uso de una cuchilla de diamante. Las secciones ultrafinas se recolectaron en rejillas de cobre de 200 mesh y se tiñeron con acetato de uranilo acuoso al 4 % durante 15 minutos, seguido de citrato de plomo de Reynolds durante 7 minutos. Las muestras se observaron con el uso de un microscopio electrónico de transmisión LEO EM910 que funciona a 80 kV (LEO Electron Microscopy, Oberkochen, Alemania). Las imágenes digitales se adquirieron con el uso de una cámara digital CCD Gatan Orius SC1000 y el programa informático Digital Micrograph 3.11.0 (Gatan, Pleasanton, CA).

Para la SEM, después de la fijación y los enjuagues, los andamios de biomatriz se deshidrataron y se transfirieron en etanol al 100 % al secador de punto crítico de Balzers CPD -020 (Bal-Tec AG, Balzers, Suiza) y se secaron con el uso de dióxido de carbono como el solvente de transición. La matriz se montó en soportes de aluminio para especímenes con lengüetas adhesivas de carbono y se recubrió con metal de oro y paladio (aleación 60:40) con un grosor de 10 nm con el uso de un metalizador de muestras Hummer X (Anatech, Worcester MA). Las muestras se examinaron con el uso de un instrumento Zeiss Supra 55 FESEM a un voltaje de aceleración de 5 kV y las imágenes digitales se adquirieron con el uso del programa informático Zeiss SmartSEM (Carl Zeiss SMT, Alemania y Thornwood, NY).

Inmunocitoquímica e inmunohistología. Para la tinción por fluorescencia de las células cultivadas en andamios de biomatriz, las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % (PFA) durante 20 min a temperatura ambiente, se enjuagaron con HBSS, se bloquearon con suero de cabra al 10 % en HBSS durante 2 h y se enjuagaron. Las células fijadas se incubaron con anticuerpos primarios a 4 °C durante toda la noche, se lavaron, se incubaron durante 1 h con anticuerpos secundarios específicos de isotipo etiquetados, se lavaron, se tiñeron por contraste con 4',6-diamidino-2-

fenilol (DAPI) para la visualización de los núcleos celulares y se observaron con el uso de un microscopio invertido Leica DMIRB (Leica, Houston, TX).

Para la inmunohistoquímica, los andamios de biomatriz se fijaron en PFA al 4 % durante toda la noche y se almacenaron en etanol al 70 %. Se incrustaron en parafina y se cortaron en secciones de 5 µm. Las secciones se desparafinaron y los antígenos se recuperaron. Las peroxidasas endógenas se bloquearon por incubación durante 30 min en solución de H₂O₂ al 0,3 %. Después de bloquear con suero de caballo al 10 %, se aplicó el anticuerpo primario a 4 °C durante toda la noche; el anticuerpo secundario y la tinción con ABC se realizaron con el uso del kit RTU Vectastain (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Se usó Vector Nova RED como sustrato. Las secciones se deshidrataron, se fijaron y se incrustaron en medio de montaje Eukitt (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA), y se analizaron con el uso de un microscopio invertido. Los anticuerpos usados para las secciones de hígado y para los cultivos se enumeran en la **Tabla 4**.

Análisis de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR). Las hHpSC se cultivaron en placas de cultivo de células y las colonias se transfirieron al andamio de biomatriz. Después del cultivo adicional durante 7 días, las colonias se lisaron para RT-PCR. El ARN total se extrajo con el uso de un Mini Kit RNeasy Plus (Qiagen GmbH, Valencia CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La transcripción inversa se llevó a cabo con el sistema de síntesis de primera cadena SuperScript para RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA). El kit de mezcla maestra HotStarTaq (Qiagen) se usó para la PCR. Los cebadores de PCR se enumeraron en la **Tabla 5**.

Ensayo VIVAS/MUERTAS y ensayo de viabilidad celular. Se usó un kit de ensayo de viabilidad VIVAS/MUERTAS (Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad, CA) para los ensayos de adhesión y proliferación. Las hHpSC o los hepatocitos se incubaron con dos sondas, calceína-AM (Vivas, gris claro) y homodímero de etidio-1 (EtDd-1, Muertas), para la actividad esterasa intracelular y la integridad de la membrana plasmática, respectivamente. Los especímenes se observaron bajo un estereomicroscopio de fluorescencia Olympus SZX12 (OLYMPUS, Japón y Melville, NY). Un kit de ensayo de viabilidad celular de resazurina (Biotium, Hayward, CA) se usó según el manual del fabricante. Brevemente, se añadió 10 % de solución de resazurina en medio de cultivo y se incubó a 37 °C durante toda la noche. La absorbancia OD₅₇₀-OD₆₀₀ se obtuvo con el uso de un lector de microplacas de detección múltiple Biotek Synergy HT (Winooski, VT) y se representó gráficamente la curva de viabilidad. Todos los experimentos se llevaron a cabo tres veces con el uso de un mínimo de tres muestras por condición experimental.

Ensayos funcionales específicos hepáticos. La actividad de CYP450 3A4 se detectó con el uso de un sistema de tamizaje P450-Glo™ (Promega, Madison, WI). Brevemente, las células cultivadas se incubaron con medio que contenía el sustrato luminogénico CYP3A4, luciferina-PPXE para CYP, durante 4 horas a 37 °C. La detección y análisis de luciferina se realizó según las instrucciones del fabricante con un contador Wallace Victor2 Multilabel (en la actualidad parte de Perkins/Elmer en Waltham, MA). La secreción de albúmina cuantitativa se realizó con el uso de un kit de ELISA de cuantificación de albúmina humana (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX). Para los ensayos de síntesis de urea, las células se incubaron con 2 mM de amonio durante 24 horas y el sobrenadante se recolectó y analizó con el kit de ensayo de urea Quantichrom (Biotest Systems, Hayward, CA). El sobrenadante de una muestra para cada condición de cultivo se analizó por triplicado y el experimento se repitió 3 veces.

Análisis estadístico. Los experimentos se repitieron al menos 2-3 veces con muestras duplicadas o triplicadas para cada condición. Se presentan los datos de experimentos representativos, mientras que se observaron tendencias similares en múltiples ensayos. Todas las barras de error representan el S.E.M.

Los andamios de biomatriz se preparan con un nuevo protocolo en cuatro etapas. Los andamios de biomatriz se prepararon con el uso de un protocolo que comprende deslipidación seguida de extracciones con alto contenido de sal y el uso de métodos de perfusión (**Figura 1**). En los métodos se proporciona una presentación detallada del protocolo. Esto se logra mediante un nuevo protocolo en cuatro etapas: 1) deslipidación suave; 2) lavados con tampones con concentraciones de sal de aproximadamente 2,0 M a aproximadamente 5,0 M (por ejemplo, 2,0 M-2,5 M, 2,6 M-3,0 M; 3,1 M-3,5 M, 3,6 M-4,0 M, 4,1 M-4,5 M; 4,6 M-5,0 M), concentraciones de sal conocidas por mantener los colágenos en un estado insoluble²³ (la concentración exacta y el pH de los tampones se encuentran determinados por los tipos de colágeno en el tejido), concentraciones conocidas por mantener los colágenos en estado insoluble²³; 3) tratamiento con nucleasas para eliminar los ácidos nucleicos residuales; y 4) enjuagues con un medio basal para eliminar los residuos de detergentes, sales y nucleasas así como equilibrar los componentes de la matriz con el medio (**Figura 1A**).

Las elecciones de los medios de enjuague o los tampones para las nucleasas pueden ser cualquiera de una serie de opciones siempre que la concentración de sal y la fuerza iónica sean tales que mantengan los componentes de la matriz en un estado insoluble. En la elección del método de deslipidación es crítico que este sea eficaz y no obstante suave. Se eligió una combinación de desoxicolato de sodio (SDC) y fosfolipasa A2 (PLA2) para degradar rápidamente el fosfoglicérido ubicado en la membrana citoplasmática y la membrana mitocondrial a lisolecitina, un tensioactivo poderoso, que puede inducir necrosis y citólisis. La fórmula reactiva se muestra en la **Figura 8**. Se evitó los detergentes fuertes, tales como dodecilsulfato de sodio (SDS) o Tritón-X 100, que podrían disolver algunos componentes de la matriz tales como los glicosaminoglicanos (ver la reseña de Gilbert y otros "Decellularization of tissues and organs" Biomaterials 27:3675-3683 (2006)).

Se evitó la exposición prolongada de los andamios a las enzimas de las células rotas durante la deslipidación y los lavados con alto contenido de sal, debido a que pueden disminuir en gran medida el contenido de elastina y el contenido de glicosaminoglicanos (GAG) tales como sulfatos de heparán (HS), sulfatos de condroitina (CS), sulfatos de dermatán (DS) y heparinas (HP), que son sitios en los que se unen las citocinas y los factores de crecimiento²⁴. Se usó el inhibidor de tripsina de soja y un control cuidadoso del pH (7,5-8,0), la temperatura (20 °C) y el tiempo (30-60 min) para limitar la actividad de las proteasas derivadas de las células rotas.

Se perfundió el tejido completo a través de la vasculatura relevante (por ejemplo, la vena porta en el hígado), lo que permitió aislar rápidamente (en pocas horas) un andamio de biomatriz con una pérdida mínima de los componentes de la matriz. La rapidez del aislamiento se debe a la etapa inicial con el detergente que deslipida el tejido en aproximadamente 30-60 minutos (no horas o días como en los protocolos usados por otros). Los andamios de biomatriz resultantes son translúcidos o blancos (**Figura 1**). Por otra parte, con el uso de este método de perfusión, se mantuvieron los canales principales de la vasculatura, la vena porta y hepática y la mayoría de las ramificaciones vasculares en el hígado, lo que aumentó la eficiencia de la descelularización. Las partículas de dextrano etiquetadas con rodamina fluorescente perfundidas a través de los andamios de biomatriz permanecieron dentro de los restos de la vasculatura lo que demuestra que son permeables (**Figura IE**) Hay un flujo progresivo sin fugas del colorante desde los vasos grandes hasta las ramificaciones de vasos sanguíneos finos a lo largo de los canales. Este hecho ayudará a la revascularización de los andamios como un medio para preparar tejidos producidos por ingeniería de tejidos para el cultivo tridimensional y/o para la implantación *ex vivo*.

Cuando se cortan en secciones, los andamios retienen la estructura histológica del tejido original, que incluye los restos reconocibles de las principales entidades histológicas tales como los vasos sanguíneos, los conductos biliares y la cápsula de Glisson (GC) (**Figura 1**). Compare las **Figuras 1B1 y 1D1**, en las que una sección del tejido hepático se compara con la de un andamio de biomatriz. Los restos de matriz de la pared de células parenquimales consistían en una red similar a un encaje (**Figuras 1D2-1D3**).

El colágeno, las proteínas asociadas y las citocinas unidas al colágeno se mantienen en los andamios de biomatriz.

La cantidad de colágeno en los andamios de biomatriz se evaluó por análisis de aminoácidos mediante métodos usados previamente²⁵. Debido a que la hidroxiprolina (Hyp) es exclusiva de los colágenos y las proteínas colagenosas, la composición de colágeno con relación a la proteína total se expresó como residuos de Hyp por 1000 aminoácidos. Los resultados demostraron que el contenido de colágeno aumentó desde niveles casi indetectables, es decir, menos de 0,2 residuos de hidroxiprolina (Hyp)/1000 en hígado, hasta ~13 residuos de Hyp/1000 en andamios de biomatriz. Esto indica que la deslipidación y los lavados con alto contenido de sal descritos anteriormente, no eliminaron los colágenos, lo que deja casi todos los colágenos en los andamios de biomatriz. La detección de niveles significativos de hidroxilisina (Hyl), otro aminoácido asociado al colágeno, y niveles más altos de glicina (Gly) en el andamio de biomatriz respalda nuestra conclusión de que el colágeno está notablemente enriquecido en los andamios de biomatriz (**Figuras 2A, 9 y Tabla 2**).

Con el uso de estudios inmunohistoquímicos y ultraestructurales, se pudo identificar en los andamios todas las formas conocidas de colágenos que se encuentran *in situ* en hígado que incluyen colágenos fibrilares (colágeno tipos I, III y V, 10-30 nm de diámetro para las fibrillas y 500-3000 nm para las fibras ensambladas) y filamentos en forma de cuentas (posiblemente tipo VI). Esas fibras y filamentos están presentes en la capa de tejido conectivo subcapsular que se encuentra debajo de la capa mesotelial. Aunque las estructuras típicas de las membranas basales no se encontraron a lo largo de los sinusoides desde las triadas portales hasta las venas centrales, se encontró que el colágeno tipo IV y algunas fibrillas pequeñas unidas forman entramados 3D porosos similares a una red, que sirven como andamio para las células parenquimales (**Figura 2**). Los haces de colágeno tipo I pueden observarse como la estructura principal de los andamios a los cuales se adhieren otros tipos de colágeno, glicoproteínas y proteoglicanos. En el espacio de Disse se encontraron pequeños haces de colágeno tipo I y fibras de los tipos de colágeno III y VI así como algunas del tipo V, que es más abundante cerca de las triadas portales y las venas centrales. Los datos inmunohistoquímicos representativos se presentan en la **Figura 3B**, y un resumen de los componentes de la matriz y su ubicación en el tejido hepático normal frente a los que están en los andamios de biomatriz se enumeran en la **Figura 4D**. Los primeros estudios en el desarrollo de los protocolos para la preparación de andamios de biomatriz indicaron que la mayoría de los componentes del citoesqueleto se pierden en los lavados. Aun así, los andamios se evaluaron por inmunohistoquímica y no se encontró evidencia de tubulina, desmina o actina, cantidades mínimas de citoqueratinas 18 y 19 y bajos niveles de vimentina diseminada en todos los andamios.

La matriz asociada con los conductos biliares y porciones de los sistemas vasculares hepáticos (vasos arteriales y venosos) consiste en estructuras de membrana basal típicas y por lo tanto es bastante distinta de las capas delgadas de la matriz asociadas con las estructuras vasculares que se encuentran en los sinusoides. La laminina, la entactina/nidógeno, el perlecán y el colágeno tipo IV se encuentran en la triada portal, mientras que solo se encuentran perlecán y algún colágeno tipo IV en el espacio de Disse. Hay presencia de cantidades enormes de elastina hidrófoba ondulada; se entrecruza y forma láminas y fibras restringidas principalmente al tejido conectivo subcapsular, regiones portales y paredes arteriales. Las fibronectinas son ubicuas y predominan en toda la matriz hepática y son

especialmente abundantes en el espacio de Disse, donde forman filamentos finos o depósitos granulares (**Figuras 2 y 3**).

La inmunohistoquímica indica que los proteoglicanos conocidos en el tejido se conservan en los andamios de biomatriz (**Figuras 3B, 4D**). Entre los proteoglicanos heterogéneos identificados, el sindecano se encontró intercalado y continuamente a lo largo de los sinusoides, y el perlecán se encuentra más puntuado en el espacio de Disse. Las formas de HS-PG y CS-PG se encuentran en todos los restos de los sinusoides en los andamios de biomatriz y en patrones que se correlacionan con la zonificación conocida del tejido hepático.

Los proteoglicanos y otros componentes de la matriz son depósitos importantes de citocinas y factores de crecimiento que se unen estrechamente a sus GAG²⁶. La mayoría de los factores de crecimiento y hormonas se encuentran en los andamios de biomatriz cerca de las concentraciones que se encuentran en el tejido original. En **Tabla 6** se proporcionan los datos de los lisados de hígados de rata frente a los andamios de biomatriz de hígado de rata, y en **Tabla 3**, se proporcionan datos paralelos del tejido de conducto biliar humano frente a los andamios de biomatriz de conducto biliar. Curiosamente, hubo algunos ejemplos (por ejemplo, bFGF) que estaban fuertemente enriquecidos en los andamios de biomatriz de hígado respecto a los encontrados en los lisados hepáticos. Los factores de crecimiento y las citocinas unidos son distintos de manera cualitativa y cuantitativa entre los andamios del hígado frente al tejido de conducto biliar, lo que implica tanto especificidad de tejido como especificidad de especie. Alternativamente, puede deberse, en parte, al hecho de que los andamios de conducto biliar se prepararon, por necesidad, mediante agitación del tejido en los tampones en un balancín y no por perfusión a través de la vasculatura.

La composición química de los andamios de biomatriz se correlaciona con la histología. Una característica significativa de este nuevo protocolo es la retención de la composición química de la matriz en patrones que se correlacionan con las zonas acinares hepáticas 1-3 desde la triada portal hasta la vena central y con entidades histológicas tales como los canales vasculares y la cápsula de Glisson (GC) como se muestra en las **Figuras 4A-C**. La composición química periportal de la matriz en la zona 1 es similar a la que se encuentra en hígados fetales y consiste, en parte, en colágeno tipo III, laminina y formas de CS-PG. Transita a una composición química de la matriz diferente en la zona acinar media (zona 2) y las zonas pericentrales (zona 3) y termina con una matriz muy estable con altos niveles de colágeno tipo IV y HP-PG²⁷.

Una miríada de proteínas (por ejemplo, factores de crecimiento y hormonas, proteínas de la coagulación, diversas enzimas) se conocen por su unión a la matriz y se mantienen de manera estable mediante la unión a los patrones discretos y específicos de sulfatación en los GAG o a otros componentes de la matriz.²⁴ Por lo tanto, la composición química de la matriz transita desde su punto de inicio en el nicho de células madre con una composición química de la matriz lábil asociada con un alto nivel de recambio y sulfatación mínima a composiciones químicas de la matriz estables y que tienen cantidades crecientes de sulfatación con progresión hacia la zona pericentral. Se espera que el mantenimiento de la arquitectura natural y la composición química de la matriz que se correlaciona con la histología faciliten la recelularización en los procesos de ingeniería de tejidos al guiar a las células a sitios específicos en los andamios de biomatriz y/o proporcionar la mezcla adecuada de señales para dirigir la expansión y/o diferenciación a células maduras.

El andamio de biomatriz puede prepararse a partir de diferentes tejidos y especies. Los andamios de biomatriz pueden prepararse fácilmente a partir de cualquier tejido, normal o enfermo y de cualquier especie. En las **Figuras 13-16** se muestran andamios de biomatriz de páncreas, árbol biliar y duodeno humanos y de páncreas de rata y porcino. En las **Figuras 5-7 y la Figura 12** se muestran los efectos de andamios de biomatriz de hígado bovino o de rata en células hepáticas. Además, se han preparado andamios de biomatriz a partir de la aorta abdominal, la vena iliaca humana y de intestino de rata y de cerdo. Los estudios histológicos, ultraestructurales e inmunohistoquímicos de los andamios de biomatriz indican una especificidad de tejido notable, pero no especificidad de especie, en su estructura, composición química y funciones.

Los andamios de biomatriz indujeron y/o mantuvieron la diferenciación de las células. La siembra de hHpSC en placas con secciones de andamios de biomatriz de hígado y en HDM adaptado para células hepáticas adultas dio lugar a la adhesión de esencialmente el 100 % de las células viables en pocas horas en los andamios de biomatriz; ya sea intactos o después de la pulverización criogénica. Las colonias de células que se formaron inicialmente en las secciones de los andamios retuvieron parte de su fenotipo de células madre ya que las células en el centro de las colonias pudieron resistir la tinción con colorantes (**Figura 11**) y expresaban marcadores clásicos de progenitoras hepáticas, tales como el receptor 4 de quimiocinas (motivo C-X-C) (CXCR4) y la molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM) (**Figura 5**). Se dividieron una o dos veces y después transitaron a la detención del ciclo celular y a morfologías tridimensionales (3-D) similares a un cordón típicas de cultivos de células parenquimales maduras (**Figuras 5 y 6** para la diferenciación de las células madre; compare con la **Figura 7 y la Figura 12**). El HDM usado no requirió todas las citocinas o factores de crecimiento habituales, ya que estos están presentes unidos a los andamios de biomatriz. La transición a la detención del crecimiento se correlacionó con la tinción en todas las colonias con colorantes de viabilidad (**Figura 12**), con pérdida de la expresión de EpCAM y CXCR4 y con un aumento estable en la expresión de genes hepatocíticos y colangiocíticos específicos de adultos tales como urea y citocromo P450 3A4. (**Figura 5**).

Los hepatocitos normales de rata adultos y humanos adultos se sembraron sobre colágeno tipo I o en andamios de biomatriz de hígados de rata o bovinos y en HDM para células adultas. Las células parenquimales adultas pudieron adherirse a los andamios en 10 minutos (incluso en medio libre de suero) frente a horas en colágeno tipo I, permanecieron en detención del crecimiento desde el punto de adhesión; y permanecieron viables y completamente funcionales durante más de 8 semanas en los andamios frente a solo aproximadamente ~2 semanas en colágeno tipo I. (**Figuras 7 y 12**). Los niveles de las funciones de las células hepáticas maduras en los andamios de biomatriz durante semanas demostraron ser iguales o similares a los hallazgos de otros de hepatocitos adultos recién aislados²⁸. Las distinciones drásticas son que los cultivos en colágeno tipo I se deterioran rápidamente después de 2 semanas, mientras que aquellos en los andamios de biomatriz permanecieron morfológica y funcionalmente estables durante el tiempo que los cultivos se mantuvieron (hasta ahora ~8 semanas).

Los andamios de biomatriz contienen la mayoría de los componentes de la matriz extracelular del tejido y las citocinas y factores de crecimiento unidos a la matriz que proporcionan un conjunto combinado de señales químicas que pueden usarse como un andamio insoluble y estable con una capacidad extraordinaria de inducir las hHpSC a los destinos hepáticos adultos así como de mantener las células adultas completamente diferenciadas durante semanas. Al comparar los tipos existentes de extractos de matriz preparados por investigadores con los del andamio de biomatriz de la presente invención, está claro que los tratamientos físicos, enzimáticos y químicos tienen efectos sustanciales sobre la composición, el comportamiento mecánico y las respuestas del huésped a los andamios biológicos derivados de la descelularización de tejidos y órganos naturales, y en consecuencia, tienen implicaciones importantes para sus aplicaciones *in vitro* e *in vivo*. Todos los demás métodos existentes para la preparación de sustratos o andamios dan lugar a la eliminación de una gran porción de los componentes de la matriz a través del uso de enzimas que degradan la matriz¹⁶ o el uso de tampones que disuelven las principales porciones de la matriz¹¹. Los métodos físicos (por ejemplo, congelación instantánea y agitación) pueden funcionar para preparar extractos de matriz a partir de tejidos con una estructura en capas tales como la dermis (por ejemplo, SIS, BSM)²⁹ pero no son útiles para órganos con estructuras tisulares complejas tales como el hígado. Por el contrario, nuestro método para andamios de biomatriz dio lugar a la pérdida de la mayoría de las proteínas celulares pero conservó esencialmente todos o al menos la mayoría de los colágenos y los componentes asociados al colágeno que incluyen las citocinas, hormonas y factores de crecimiento unidos a la matriz.

La matriz extracelular se incrusta en una bicapa lipídica en mosaico, que incluso en el organismo más simple es un ambiente complejo, heterogéneo y dinámico. El método de deslipidación es una faceta crítica del protocolo. Los métodos usados comúnmente para la descelularización de tejidos involucran detergentes iónicos tales como SDC y dodecilsulfato de sodio (SDS). El SDC es relativamente más suave que el SDS, tiende a provocar menos ruptura de la arquitectura tisular natural y es menos eficaz para solubilizar las membranas celulares citoplasmáticas y nucleares³⁰. No hay informes de descelularización de tejidos con el uso de SDC solo. Muchos estudios han hecho uso de un detergente no iónico fuerte (por ejemplo, Tritón X-100)³¹ o detergentes zwitteriónicos (por ejemplo, 3-(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato, CHAPS)³². Por el contrario, nuestro método de usar una combinación de SDC y PLA2 deslipidó el tejido de manera rápida y suave.

Hasta el momento se han identificado al menos veintinueve tipos de colágenos (I-XXIX) en vertebrados con roles funcionales en la adhesión celular, la diferenciación, el crecimiento, el desarrollo y la integridad estructural de los tejidos^{33,34}. Se conoce que los principales componentes estructurales en la matriz, los colágenos, permanecen insolubles en altas concentraciones de sal y a pH neutro^{35,36}, un hallazgo que es la base de nuestra estrategia en la preparación de andamios de biomatriz. La estrategia tiene las ventajas añadidas de que los colágenos permiten la conservación de los componentes de la matriz unidos a ellos, tales como lamininas y fibronectinas (FN), proteoglicanos (PG) pequeños ricos en leucina y GAG que a su vez conservan las citocinas, los factores de crecimiento o los receptores de superficie celular que se unen a ellos.

Los andamios de biomatriz son únicos en su profunda capacidad de inducir la diferenciación rápida y consistente de células madre/progenitoras tales como hHpSC a destinos adultos y de mantener esas células de linaje restringido y de mantener esas células de linaje restringido o también mantener las células adultas sembradas en los andamios, como células viables y completamente funcionales durante muchas semanas (>8 semanas).

La diferenciación de células madre, tales como células madre embrionarias (ES), células madre pluripotentes inducidas (iPS) o formas variables de células madre mesenquimales (MSC) a tipos de células hepáticas completamente maduras requiere múltiples conjuntos de señales (solubles y de la matriz) presentadas en etapas, la inducción por un conjunto requiere la sensibilización para responder a un conjunto diferente, y puede demorar muchas semanas, hasta 6 semanas de cultivo, generar células que tienen el destino hepático adulto³⁷. Por otra parte, la restricción del linaje de las MSC a los destinos hepáticos proporciona resultados inconsistentes con las células adultas que tienen fenotipos mixtos de hepatocitos y MSC. La diferenciación de células ES, células iPS y MSC da lugar a células similares a hepatocitos que expresan algunos, pero nunca todos, de los principales genes específicos del hígado; con variabilidad en qué genes se observan; y los niveles de proteína para esos genes hepáticos expresados usualmente son bajos⁴⁰ o altos para un gen hepático e insignificantes para otros^{41,42}. Por el contrario, la diferenciación de las hHpSC en los andamios de biomatriz dio lugar a que esencialmente todas las células expresaran un fenotipo adulto clásico y con actividades de urea, albúmina y CYP450 a niveles que son casi normales después de una semana en cultivo.

Las células similares a hepatocitos de cualquiera de estas precursoras y diferenciadas por protocolos distintos a los andamios de biomatriz, expresan algunos, pero nunca todos, los principales genes específicos del hígado, con variabilidad en qué genes se observan, y los niveles de proteína de los genes hepáticos son usualmente bajos o altos para un gen hepático e insignificantes para otros. Por razones desconocidas, los resultados son diferentes entre preparaciones. Se espera que la utilización de los andamios de biomatriz de esta invención de lugar a una diferenciación más rápida de estas poblaciones de células madre y con mayor consistencia en el logro de células con un fenotipo adulto estable.

La diferenciación de poblaciones de células madre determinadas, tales como hHpSC en los andamios de biomatriz dio lugar a que esencialmente todas las células expresaran un repertorio clásico de genes adultos y con actividades de urea, albúmina y CYP450 a niveles casi normales en 1 a 2 semanas en cultivo y con estabilidad de ese fenotipo durante muchas semanas. Por lo tanto, los andamios de biomatriz de la presente invención tienen el potencial de facilitar en gran medida la diferenciación de poblaciones de células madre determinadas a un fenotipo hepático adulto.

La capacidad de diferenciar células madre en los andamios de biomatriz para lograr células y tejidos maduros y funcionales ofrece considerables oportunidades para programas académicos, industriales y clínicos al permitir el uso de tipos de células bien diferenciados para cada tipo de estudio analítico, y, lo que es más fascinante, permitir la generación de tejidos, o incluso órganos, implantables y revascularizados que podrían usarse para programas de investigación básica y clínicos.

REFERENCIAS DEL EJEMPLO 1

1. Lanza, R. y otros Handbook of Stem Cells, Vol. 2 volúmenes. (Elsevier Academic Press, Nueva York; 2004).
2. Vacanti, J.P. & Langer, R. Tissue engineering: the design and manufacturing of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. Lancet 354 Supl 1, SI32-34 (1999).
3. *Schmelzer, E. y otros Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. Journal of Experimental Medicine 204, 1973-1987 [*primeros autores equivalentes;**autores sénior equivalentes] (2007).
4. Zhang, L., Theise, N., Chua, M. & Reid, L.M. Human liver stem cells and hepatoblasts: Symmetry between Liver Development and Liver Regeneration. Hepatology 48, 1598-1607 (2008).
5. Kubota, H. & Reid, L.M. Clonogenic hepatoblasts, common precursors for hepatocytic and biliary lineages, are lacking classical major histocompatibility complex class I antigens. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97, 12132-12137 (2000).
6. Wauthier, E. y otros Liver stem cells and hepatoblasts: identification, isolation and ex vivo maintenance Methods for Cell Biology (Methods for Stem Cells) 86, 137-225 (2008).
7. Rhodes, J.M. & Simons, M. The extracellular matrix and blood vessel formation: not just a scaffold. Journal of Cell and Molecular Medicine 11, 176-205 (2007).
8. Chen, S.S., Fitzgerald, W., Zimmerberg, J., Kleinman, H.K. & Margolis, L. Cell-cell and cell-extracellular matrix interactions regulation embryonic stem cell differentiation. Stem Cells 25, 553-561 (2007).
9. Daley, W.P., Peters, S.B. & Larsen, M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. Journal of Cell Science 21, 255-264 (2008).
10. Chun, S.Y. y otros Identification and characterization of bioactive factors in bladder submucosa matrix. Biomaterials 28, 4251-4256 (2007).
11. Huber, J.E., Spievack, A., Simmons-Byrd, A., Ringel, R.L. & Badylak, S. Extracellular matrix as a scaffold for laryngeal reconstruction. Ann Otol Rhinol Laryngol 112, 428-433 (2003).
12. Liotta, L.A., Lee, C.W. & Morakis, D.J. New method for preparing large surfaces of intact human basement membrane for tumor invasion studies. Cancer Letters 11, 141-152 (1980).
13. Kleinman, H.K., McGarvey, M.L., Hassell, J.R. & Martin, G.R. Formation of a supramolecular complex is involved in the reconstitution of basement membrane components. Biochemistry 22, 4969-4974 (1983).
14. Vlodavsky, I., Levi, A., Lax, I., Fuks, Z. & Schlessinger, J. Induction of cell attachment and morphological differentiation in a pheochromocytoma cell line and embryonal sensory cells by the extracellular matrix. Developmental Biology (Orlando) 93, 285-300 (1982).

15. Gospodarowicz, D., Delgado, D. & Vlodavsky, I. Permissive effect of the extracellular matrix on cell proliferation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77, 4094-4098 (1980).
- 5 16. Badylak, S.F. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Semin Cell Dev Biol* 13, 377-383 (2002).
17. Gilbert, T.W. y otros Collagen fiber alignment and biaxial mechanical behavior of porcine urinary bladder-derived extracellular matrix. *Biomaterials* 16 (2008).
- 10 18. Lee, M., Chang, P.C. & Dunn, J.C. Evaluation of small intestinal submucosa as scaffolds for intestinal tissue engineering. *Journal of Surgical Research* 147, 168-171 (2008).
19. Martin, N.D. y otros In vivo behavior of decellularized vein allografts. *Journal of Surgical Research* 129, 17-23 (2005).
- 15 20. Ott, H.C. y otros Perfusion-decellularize matrix using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nature Medicine* 14, 213-221 (2008).
21. Macchianni, P. y otros Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet* 372, 2023-2030 (2008).
- 20 22. Franklin, M.E., Jr. y otros The use of porcine small intestinal submucosa as a prosthetic material for laparoscopic hernia repair in infected and potentially contaminated fields: long-term follow-up. *Surgical Endoscopy* 22, 1941-1946 (2008).
- 25 23. Miller, E.J. & Rhodes, R.K. Preparation and characterization of the different types of collagen. *Methods in Enzymology* 82, Parte A, 33-64 (1982).
24. Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, J.D., Leder, P. & Ornitz, D.M. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell Molecular Life Science* 64, 841-848 (1991).
- 30 25. Yamuchi, M. & Shiba, M. Lysine hydroxylation and cross-linking of collagen. *Methods in Molecular Biology* 446, 95-108 (2008).
26. Liu, Y., Cai, S., Shu, X.Z., Shelby, J. & Prestwich, G.D. Release of basic fibroblast growth factor from a crosslinked glycosaminoglycan hydrogel promotes wound healing. *Wound Repair Regen* 15, 245-251 (2007).
- 35 27. Martinez-Hernandez, A., Delgado, F.M. & Amenta, P.S. The extracellular matrix in hepatic regeneration. Localization of collagen types I, III, IV, laminin, and fibronectin [la errata publicada aparece en Lab Invest 1991 Agosto;65(2):257]. *Laboratory Investigation* 64, 157-166 (1991).
- 40 28. LeCluyse, E.L. Human hepatocyte culture systems for the in vitro evaluation of cytochrome P450 expression and regulation. *Eur J Pharm Sci* 13, 343-368. (2001).
29. Brown, B., Lindberg, K., Reing, J., Stolz, D.B. & Badylak, S.F. The basement membrane component of biologic scaffolds derived from extracellular matrix. *Tissue Engineering* 12, 519-526 (2006).
- 45 30. Seddon, A.M., Curnow, P. & Booth, P.J. Membrane proteins, lipids and detergents, not just a soap opera. *Biochimica Biophysica Acta* 1666, 105-117 (2004).
- 50 31. Ozeki, M. y otros Evaluation of decellularized esophagus as a scaffold for cultured esophageal epithelial cells. *Journal of Biomedical Materials. Research A* 79, 771-778 (2006).
32. Rieder, E. y otros Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to decellularization with human vascular cells. *Journal of Thoracic Cardiovascular Surgery* 127, 399-405 (2004).
- 55 33. Olsen, B.R. & Ninomiya, Y. *Collagens: Guidebook to the Extracellular Matrix and Adhesion Proteins*. (Oxford University Press, Oxford; 1993).
34. Yurchenco, P.D. & O'Rear, J.J. Basement membrane assembly. *Methods Enzymol* 245, 489-518 (1994).
35. Seyer, J.M., Hutcheson, E.T. & Kang, A.H. Collagen polymorphism in normal and cirrhotic human liver. *J Clin Invest* 59, 241-248 (1977).
- 65 36. Traub, W. & Piez, K.A. The chemistry and structure of collagen. *Advances in Protein Chemistry* 25, 243-352 (1971).

37. D'Amour, K.A. y otros Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* 24, 1392-1401 (2006).
38. Pittenger, M.F. y otros Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147. (1999).
39. Kazemnejad, S. y otros Biochemical and molecular characterization of hepatocyte-like cells derived from human bone marrow mesenchymal stem cells on a novel three-dimensional biocompatible nanofibrous scaffold. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 24, 278-287 (2009).
40. Lysy, P.A., Smets, F., Najimi, M. & Sokal, E.M. Leukemia inhibitory factor contributes to hepatocyte-like differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Differentiation* 76, 1057-1067 (2008).
41. Campard, D., Lysy, P.A., Najimi, M. & Sokal, E.M. Native Umbilical Cord Matrix Stem Cells Express Hepatic Markers and Differentiate Into Hepatocyte-like Cells. *Gastroenterology* 134, 833-848 (2008).
42. Song, Z. y otros Efficient generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. *Cell Research*, en prensa. Publicación electrónica el 8 de septiembre (2009).
43. Hayes, A., Tudor, D., Nowell, M., Caterson, B. & Hughes, C. Unique forms of chondroitin sulfate proteoglycans in stem cell niches. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 56, 125-138. (2007).
44. Couvelard, A. y otros Expression of integrins during liver organogenesis in humans. *Hepatology* 27, 839-847 (1998).
45. Lyon, M., Deakin, J.A. & Gallagher, J.T. Liver heparan sulfate structure. A novel molecular design. *Journal of Biological Chemistry* 269, 11208-11215 (1994).
46. Vongchan, P. y otros Structural characterization of human liver heparan sulfate. *Biochim Biophys Acta* 1721, 1-8 (2005).
47. Wauthier, E. y otros Liver stem cells and hepatoblasts: identification, isolation and ex vivo maintenance *Methods for Cell Biology (Methods for Stem Cells)* 86, 137-225 (2008).
48. Kubota, H. & Reid, L.M. Clonogenic hepatoblasts, common precursors for hepatocytic and biliary lineages, are lacking classical major histocompatibility complex class I antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 12132-12137 (2000).
49. *Schmelzer, E. y otros Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *Journal of Experimental Medicine* 204, 1973-1987 [*primeros autores equivalentes;**autores sénior equivalentes] (2007).
50. Schmelzer, E., Wauthier, E. & Reid, L.M. Phenotypes of pluripotent human hepatic progenitors. *Stem Cell* 24, 1852-1858 (2006).
51. Yamauchi, M. & Shiiba, M. Lysine hydroxylation and cross-linking of collagen. *Methods Molecular Biology* 446, 95-108 (2008).
52. Gilbert y otros Quantification of DNA in biologic scaffold materials. *Journal of Surgical Research* 152:135-139 (2009).

EJEMPLO 2. Métodos para la dispersión a escala industrial de andamios de biomatriz.

Se desarrollaron métodos adicionales para dispersar los andamios de biomatriz en placas después de la pulverización en GigaCyte, LLC (Branford, CT). Pueden usarse con andamios de biomatriz de cualquier tejido que incluye mamíferos grandes (por ejemplo, tejidos humanos, porcinos y bovinos, etcétera). Se obtuvieron tejidos porcinos y bovinos de una instalación de procesamiento de carne certificada por el USDA, se transportaron en RPMI 1640). Este medio puede ser cualquier medio con una composición que imita los constituyentes del líquido intersticial y con una osmolalidad que está en el intervalo de 250-350 mOsm/Kg. Después, los tejidos se procesan como se describe en la presente descripción para generar andamios de biomatriz.

Estos métodos incluyen el procesamiento adicional de andamios de biomatriz para la reducción a partículas de tamaño μm en suspensión para recubrir placas con el uso de automatización. En un ejemplo no limitante, el proceso incluye la homogeneización del andamio de biomatriz en una solución con alto contenido de sal para garantizar que los colágenos permanezcan insolubles. Un tampón deslipidante modificado que comprende 36 unidades/l de fosfolipasa A2 más desoxicolato de sodio al 1 % e inhibidor de tripsina de soja a 0,1 mg/ml se añade a una relación de tampón:homogeneizado 1:1, lo que da lugar a que el material de biomatriz flote en la parte superior donde se recolecta

para el procesamiento posterior. El material de biomatriz se procesa adicionalmente para eliminar el tampón deslipidante y se lava con solución de nucleasas para eliminar las nucleasas: RNasa 5 mg/100 ml, DNasa 1 mg/100 ml e inhibidor de tripsina de soja a 0,1 mg/ml. Después, el material de biomatriz se procesa adicionalmente en un tampón con alto contenido de sal (>3,4 M de NaCl) para garantizar la eliminación de todos los residuos, para mantener los colágenos insolubles y también para minimizar la actividad de las proteasas. El material de biomatriz se procesa adicionalmente para eliminar la alta concentración de sal a preparar para la reducción del tamaño de partícula mediante lavado del material de biomatriz en medio basal que contiene antimicrobiano/antimicóticos, gentamicina y tampón HEPES. Después, el material de biomatriz se procesa adicionalmente para reducir el tamaño de partícula del material de biomatriz a partículas de tamaño μm (intervalo de 1-100 μm) en suspensión, a cualquier dilución, óptimamente a 1:6, en medio basal que contiene antimicrobiano/antimicóticos, gentamicina y tampón HEPES, se congela a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y después se pulveriza mediante trituración criogénica. Si la biomatriz no se diluye antes de la trituración, la matriz es demasiado grumosa para recubrir las placas de manera uniforme. Esta es una etapa fundamental para permitir la trituración y el recubrimiento uniforme de las placas. Las partículas de biomatriz pueden estar en suspensión a cualquier dilución pero óptimamente 1:6. Las partículas de biomatriz se descongelan y se recubren sobre placas que se usan para la diferenciación de células madre. Las partículas de biomatriz pueden diluirse, además, a cualquier dilución, óptimamente 1:24 en medio basal que contiene antimicrobiano/antimicóticos, gentamicina y tampón HEPES y se recubren sobre placas que se usan para el mantenimiento a largo plazo de tipos de células primarias terminalmente diferenciadas recién aisladas, crioconservadas o derivadas de células madre, o para la diferenciación de cualquier fuente de células madre a hepatocitos. La esterilización de las placas recubiertas con biomatriz puede realizarse, por ejemplo, con irradiación gamma (5000 rads) y almacenarse a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (o congelarse a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) hasta su uso. La siembra de células sobre la biomatriz no requiere un medio que contiene suero para la adhesión pero puede usarse un medio que contiene suero para aplicar las células a la biomatriz. La composición de partículas de biomatriz de cualquier tejido puede usarse para recubrir placas y otros aparatos.

Como otro ejemplo, la presente invención proporciona un método para producir un andamio de biomatriz a partir de tejido biológico para la dispersión a escala industrial sobre aparatos de cultivo, que comprende: a) producir un andamio de biomatriz de acuerdo con cualquiera de los métodos de esta invención como se describe en la presente descripción, b) diluir el andamio de biomatriz de (a) en medio basal; c) congelar el andamio de biomatriz de (b) a aproximadamente $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$; d) pulverizar el andamio de biomatriz de (c) mediante trituración criogénica en partículas de biomatriz que varían en tamaño de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 100 μm (por ejemplo, aproximadamente 1 μm , 2 μm , 5 μm , 10 μm , 15 μm , 20 μm , 25 μm , 30 μm , 40 μm , 50 μm , 60 μm , 70 μm , 80 μm , 90 μm , 95 μm , 100 μm , 110 μm , 120 μm , 150 μm , 200 μm , etcétera); e) descongelar las partículas de biomatriz de (d) en suspensión en medio basal; y f) dispersar las partículas de biomatriz de la etapa (e) sobre un aparato de cultivo; para producir así un andamio de biomatriz a partir de tejido biológico para la dispersión a escala industrial sobre aparatos de cultivo. En algunas modalidades, este método puede comprender, además, la etapa de esterilizar las partículas de biomatriz que puede llevarse a cabo, por ejemplo, por irradiación gamma.

En algunas modalidades de los métodos descritos anteriormente, el andamio de biomatriz de la etapa (b) puede diluirse a una relación de aproximadamente 1:6 (por ejemplo, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, etcétera) en el medio basal. En algunas modalidades, las partículas de biomatriz de la etapa (e) pueden diluirse a aproximadamente 1:24 (por ejemplo, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20, 1:21, 1:22, 1:23, 1:24, 1:25, 1:26, 1:27, 1:28, 1:29, 1:30, etcétera) en medio basal.

RESUMEN DEL PROTOCOLO ILUSTRATIVO USADO PARA HÍGADO ADULTO

Inhibidor de tripsina de soja 1000x

- Concentración final 0,1 mg/ml

Solución de transporte de tejidos

- Medio basal tal como RPMI 1640 o solución salina tamponada con fosfato con calcio y magnesio
- Solución de antibiótico/antimicótico 100x (Gibco #15240-112)
- Gentamicina (25 ug/ml) (Gibco # 15710-072)

Solución 1: Solución de mezcla de tejidos

- 3,4 M de NaCl
- Inhibidor de tripsina de soja a 0,1 mg/ml (Gibco # 17075-029)

Solución 2: Solución de deslipidación

- Una mezcla de Solución 1 con 1:1 PBS (c/Ca & Mg); las relaciones alternativas son 1:2, 1:3, 1:4) o alternativamente un medio basal tal como RPMI 1640

5

- Desoxicolato de sodio al 0,1 % (Sigma D6750-100 g)
- Fosfolipasa A2 36 u/l (Sigma P9279-25 mg)
- Inhibidor de tripsina de soja a 0,1 mg/ml (Gibco # 17075-029)

10 **Solución 3: Solución de nucleasas**

- Medio basal tal como RPMI 1640
- RNasa 5 mg/100 ml (Sigma R6513-1 g)
- DNasa 1 mg/100 ml (DN25-1 g)
- Inhibidor de tripsina de soja a 0,1 mg/ml

15

20 **Solución 4: Solución con alto contenido de sal**

- 3. M de NaCl

Solución 5: Solución de eliminación de sal y trituración

25

- E de William
- Antibiótico/antimicótico (100x)
- Gentamicina (30 ug/ml)

30

Etapas en el proceso de aislamiento de biomatriz para órganos grandes

1. Homogeneización del tejido en alto contenido de sal
2. Descelularización y deslipidación
3. Eliminación de nucleasas
4. Lavado con alto contenido de sal
5. Eliminación de la sal
6. Reducción del tamaño de partícula de la biomatriz
7. Recubrimiento de placas con biomatriz

35

40

45

Proceso de aislamiento de biomatriz

50 **1.0 Aproveccionamiento de tejido**

- 1.1 Obtener tejido del órgano de una instalación certificada e inspeccionada por el USDA

55

- 1.2 Transportar el tejido del órgano desde la instalación USDA al laboratorio GigaCyte en contenedor de plástico en solución de transporte de tejidos

60

- 1.3 Preparar el tejido para la perfusión o la homogeneización

- 1.3.1 La homogeneización se prefiere para la aplicación *in vitro* en placas de múltiples pocillos

2.0 Homogeneización del tejido

- 2.1 Asépticamente, cortar el tejido en pedazos pequeños (~3x3 cm) con bisturí núm. 22 y colocar en solución de transporte de tejidos para eliminar la sangre
- 5 2.2 Enjuagar los pedazos de tejido 3-4 veces en solución de transporte de tejidos para eliminar toda la sangre posible
- 2.3 Homogeneizar ~ 400 g de tejido en igual volumen de Solución 1 hasta que la mezcla sea homogénea (~3-5 min.)
- 10 2.4 Verter la solución de tejido homogeneizado en un frasco cilíndrico de 2 l para la descelularización
- 2.5 Repetir para todo el lote de pedazos de tejido
- 15 **3.0 Descelularización y deslipidación**
- 3.1 Añadir igual volumen de Solución 2 al tejido homogeneizado en el frasco cilíndrico
- 3.2 Mezclar bien varias veces por inversión del frasco, después dejar reposar durante 15-30 minutos
- 20 3.3 El material de matriz flotante se elevará a la parte superior lo que crea una separación definida del material de matriz ligero encima de la solución coloreada hepática
- 3.4 Extraer con pipeta el material de matriz flotante y transferir a otro frasco cilíndrico
- 25 3.5 Combinar la matriz de múltiples homogeneizaciones
- 3.6 Transferir ~375 ml de material de matriz a un frasco de centrifuga de 750 ml, añadir igual volumen de Solución 2 a cada frasco y agitar vigorosamente durante ~ 1 minuto para garantizar la completa descelularización y deslipidación
- 30 3.7 Sedimentar por centrifugación a velocidad alta (3750 RPM) durante 10 minutos, después eliminar el sobrenadante
- 3.8 Repetir este proceso 1 vez más (2 veces en total)
- 35 **4.0 Eliminación de nucleasas**
- 4.1 Eliminar el sobrenadante después del lavado final de descelularización, cuidando de no alterar el sedimento de biomatriz
- 40 4.2 Añadir igual volumen de Solución 3 a cada frasco y agitar vigorosamente durante ~ 1 min para garantizar que todo el material esté en suspensión y que se eliminen completamente las nucleasas
- 4.3 Sedimentar por centrifugación a velocidad alta (3750 RPM) durante 10 minutos, después eliminar el sobrenadante
- 45 4.4 Repetir este proceso 1 vez más. (2 veces en total)
- 5.0 Lavado con alto contenido de sal**
- 50 5.1 Eliminar el sobrenadante después del lavado final de nucleasas, cuidando de no alterar el sedimento de biomatriz
- 5.2 Añadir igual volumen de Solución 4 a cada frasco y agitar vigorosamente cuidando de garantizar que todo el material esté en suspensión
- 55 5.3 Sedimentar por centrifugación a velocidad alta (3750 RPM) durante 10 minutos, después eliminar el sobrenadante
- 5.3.1 En esta fase la biomatriz no sedimenta bien y flota después de la centrifugación.
- 60 5.3.2 Extraer el sobrenadante con pipeta y pasarlo a través de un filtro de nailon para recolectar el material flotante
- 5.3.3 Devolver la matriz flotante recolectada al frasco de centrifuga
- 65 5.4 Repetir este proceso al menos 2 veces antes de parar

- 5.4.1 El sobrenadante es de color ligeramente tostado a claro después del lavado final con sal
- 5.5 Después del 2^{do} lavado con alto contenido de sal es un buen punto de parada si se hace tarde en el día.
- 5 5.6 Verter los contenidos de todos los frascos de centrifuga en un frasco cilíndrico y rellenar con Solución 4, después poner la biomatriz a 4 °C durante la noche.
- 5.7 Al día siguiente continúan los lavados con sal restantes
- 10 5.8 Agitar vigorosamente el frasco de biomatriz para mezclar bien el material de biomatriz y después transferir la biomatriz a los frascos de centrifuga y continuar con 3-4 lavados más con sal
- 5.9 Condensar la biomatriz en tan pocos frascos como sea posible llenando cada uno hasta la mitad como máximo para permitir los lavados con sal
- 15 **6.0 Eliminación de la sal**
- 6.1 Eliminar el sobrenadante después del lavado final con sal cuidando de no alterar el sedimento de biomatriz
- 20 6.2 Añadir igual volumen de Solución 5 y agitar vigorosamente para garantizar que todo el material de biomatriz esté en suspensión
- 6.3 Sedimentar por centrifugación a velocidad alta (3750 RPM) durante 10 minutos
- 25 6.4 Eliminar el sobrenadante y añadir igual volumen de Solución 5, después agitar vigorosamente.
- 6.5 Repetir 2 veces (3 veces en total) para garantizar que el sobrenadante esté claro
- 30 6.5.1 La biomatriz sedimentará mejor con cada centrifugación
- 6.5.2 El sobrenadante debe estar claro sin color alguno después del lavado final
- 6.6 Después del lavado final con Solución 5, registrar el volumen de los sedimentos de matriz de cada frasco
- 35 6.7 Transferir y combinar todos los sedimentos de biomatriz en un nuevo frasco cilíndrico
- 6.8 Medir el volumen del material de biomatriz
- 6.9 Diluir 1:6 con Solución 5 la biomatriz combinada
- 40 6.9.1 Calcular la cantidad de Solución 5 requerida
- 6.9.1.1 Ejemplo: 200 ml de biomatriz x 6 = 1200
- 45 6.9.1.2 Añadir 1 l de Solución 5 a 200 ml de biomatriz para una suspensión de biomatriz 1:6
- 6.10 Preparar alícuotas de 30 ml de suspensión de biomatriz 1:6 en bolsas de congelación previamente etiquetadas
- 50 6.11 Congelar las bolsas de biomatriz a -80 °C y almacenar hasta la trituración
- 6.12 Preparar una "hoja de datos de trituración de lotes de biomatriz" para el nuevo lote de biomatriz
- 55 6.12.1 Registrar el número de bolsas producidas a partir de este nuevo lote
- 6.12.2 Cada bolsa es una trituración separada del mismo lote
- 6.13 El material de biomatriz producido a partir de este lote se considera un lote
- 60 6.14 Asignar un número de lote al lote
- 7.0 Reducción del tamaño de partícula de la biomatriz**
- 7.1 Preparar el molino triturador (Spex Sample Prep 6870) con LN2 y enfriar la cámara de trituración
- 65 7.2 Retirar la bolsa de biomatriz congelada del congelador

- 7.3 Dividir en pequeños pedazos
- 7.4 Transferir los pedazos de biomatriz congelada a la cámara del molino triturador previamente enfriada
- 5 7.5 Triturar en 2 series (una serie es de 12 trituraciones x 2 minutos cada una, seguido de 2 minutos de enfriamiento) de 48 minutos cada una en molino criogénico
- 7.6 Transferir la biomatriz triturada a un frasco de 100 ml previamente etiquetado con el número de lote y el número de bolsa (el número de bolsa identifica la fecha de trituración)
- 10 7.7 Mantener en congelación a -80 °C hasta que esté listo para recubrir placas
- 8.0 Preparación de la biomatriz para recubrir placas**
- 15 8.1 Descongelar un frasco de biomatriz por el método de descongelación rápida en baño de agua a 37 °C
- 8.2 Medir la suspensión de biomatriz descongelada (debería ser ~30 ml ± 2 ml)
- 8.3 Diluir a 1:24 con Solución 5 (ver la **Figura 17**)
- 20 8.3.1 Calcular el volumen de Solución 5 a añadir a la suspensión de biomatriz 1:6
- 8.3.1.1 Multiplicar el volumen de suspensión de biomatriz x 3
- 25 8.3.1.2 Añadir ese volumen a la suspensión 1:6 para una dilución 1:24
- 8.4 Recubrir las placas inmediatamente (dejar que la matriz repose dará lugar a la formación de grumos)
- 9.0 Recubrimiento de placas con biomatriz**
- 30 **9.1** Determinar el número de placas a recubrir. Referirse a la **Tabla 8** para los volúmenes a dispersar en las placas
- 35 • Asépticamente, retirar las placas del empaque y organizarlas en la campana de flujo laminar
- Transferir el volumen apropiado de suspensión de biomatriz a cada pocillo con el uso de una pipeta multicanal cuando corresponda. Consultar la Tabla 1 para el volumen a dispersar en las placas
- 40 • Garantizar que la suspensión se distribuya de manera uniforme en los pocillos, golpee suavemente la placa si es necesario, pero no la retire de la superficie plana de la campana.
- Dejar que las placas permanezcan en reposo durante toda la noche
- 45 • Los primero al día siguiente es eliminar la solución de cada pocillo
- Manipular las placas cuidadosamente de manera que el recubrimiento de matriz no se altere
- Inclinar la placa hacia usted sin retirar el borde de la placa de la superficie de la campana. Esto estabiliza la placa para evitar los movimientos involuntarios que harán que la biomatriz se derrame de la placa
- 50 ○ Usar el aparato de succión con pipeta de punta fina para aspirar toda la solución de cada pocillo. **¡¡¡NO TOQUE LA SUPERFICIE DE LA MATRIZ CON LA PIPETA!!!**
- Colocar la placa boca abajo suavemente, retirar la tapa y dejar que se seque completamente (~2 horas)
- 55 ■ Mover la placa mientras está húmeda altera el recubrimiento de biomatriz
- No mueva las placas hasta que la matriz esté seca
- 60 ○ Cuando esté completamente seca, reemplace la tapa y examine la calidad
- Colocar las placas que tengan un recubrimiento liso en la bolsa de placas
- Sellar la bolsa y aplicar la etiqueta
- 65 ○ Esterilizar por irradiación gamma (5000 rads)

- Almacenar las placas recubiertas en 4 °C
- Enviar las placas recubiertas en paquetes de 5 en un paquete de hielo

5 10.0 Uso de las placas con biomatriz

10.1 Asépticamente, retirar la placa del empaque y colocarla en el gabinete de seguridad biológico

10.2 Añadir medio a cada pocillo y colocar en una incubadora durante al menos 2 horas antes del uso

10.3 Cuando esté listo para sembrar las células, elimine los medios de rehidratación y lave una vez con medio de cultivo de tejidos

10.4 Añadir las células

Lo anterior es ilustrativo de la presente invención y no debe interpretarse como limitante de la misma. La invención se define en las siguientes reivindicaciones, los equivalentes de las reivindicaciones se incluyen en ellas. Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes, publicaciones de patentes, secuencias identificadas por los números de acceso de la base de datos GenBank® y/o de SNP, y otras referencias citadas en la presente descripción se incorporan como referencia en su totalidad por las enseñanzas relevantes para la oración y/o párrafo en que se presenta la referencia.

Tabla 1: Intervalos de concentración molar de NaCl para los tipos de colágeno I-V.

Tipo de colágeno	Fuente	Intervalo de concentración molar de NaCl para la precipitación (por lo tanto, insolubilidad a la concentración especificada y/o a concentraciones por encima de las enumeradas)	
		pH ácido	pH neutro
I	Piel	0,7-0,9	2,6
I Trimerico	Piel	0,7-0,9	4,0
III	Piel	0,7-,09	1,5-1,7
IV	Placenta	1,2	1,7-2,0
V	Amnios y corion; placenta	1,2	3,6-4,5
Referencia: Paul Bornstein y Helene Sage (1980) Structurally Distinct Collagen Types. Annual Review of Biochemistry. 49:957-1003.			

Estos datos son representativos de las condiciones para la insolubilidad de los tipos de colágenos. Se debe identificar los tipos de colágeno en un tejido y después usar la concentración de sal más alta identificada para esos colágenos en el tejido al igual que para los tampones usados para preparar los andamios de biomatriz. Por ejemplo, para la piel, se usaría un tampón a pH neutro y con una concentración de sal de 4,0 M, una concentración de sal que mantendría insolubles los colágenos de tipo I y III. Por el contrario, para la placenta, se usaría un tampón a pH neutro y 4,5 M de sal para mantener insolubles el colágeno tipo IV y el colágeno tipo V.

Los tipos de colágenos presentes en un tejido son distintos a diferentes edades de un huésped. Por ejemplo, los hígados fetales tienen altos niveles de colágenos tipo III, IV y V (que requieren concentraciones de sal por encima de 4,0 M), mientras que los hígados adultos tienen una mezcla de colágenos tipo I, III, IV, V, VI y XVIII (que requieren concentraciones de sal más bajas). Por lo tanto, la concentración de sal necesaria para la preparación de andamios de biomatriz se encuentra determinada por el repertorio de colágenos que predomina en el tejido. Ver la referencia 23 del Ejemplo 1 para más detalles.

Tabla 2. Análisis del contenido de colágeno en el andamio de biomatriz de hígado

Aminoácidos	ANDAMIOS DE BIOMATRIZ (N=4)								TEJIDO HEPÁTICO (N=3)													
	muestra 1		muestra 2		muestra 3		muestra 4		PROMEDIO		SD		muestra 1		muestra 2		muestra 3		PROMEDIO		SD	
	Res/1000		Res/1000		Res/1000		Res/1000		Res/1000		Res/1000		Res/1000		Res/1000		Res/1000		Res/1000		Res/1000	
Hyp	10,0	13,8	15,3	12,1	12,8	2,3	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*	
Asp	82,7	77,1	78,4	85,5	80,9	3,9	93,0	94,5	90,8	92,8	1,8											
Thr	52,6	51,1	45,6	52,4	50,4	3,3	52,2	51,0	53,7	52,3	1,3											
Ser	56,5	53,7	61,9	62,4	58,6	4,2	57,7	57,0	62,0	58,9	2,7											
Glu	112,0	107,0	117,4	118,1	113,6	5,2	123,9	122,0	130,1	125,4	4,2											
Pro	52,3	52,2	55,7	51,6	52,9	1,9	46,6	45,9	46,4	46,3	0,4											
Gli	118,7	134,0	125,4	109,4	121,9	10,4	88,2	84,6	89,1	87,3	2,4											
Ala	88,3	86,1	89,5	83,6	86,9	2,6	79,0	78,2	90,6	82,6	7,0											
Val	64,3	57,2	54,8	65,9	60,6	5,4	71,6	71,3	70,1	71,0	0,8											
Met	21,7	20,6	20,7	20,4	20,8	0,6	21,4	21,4	21,7	21,5	0,2											
Ile	51,8	47,7	47,4	41,7	47,2	4,2	49,6	50,1	42,3	47,3	4,3											
Leu	92,7	83,8	109,7	87,5	93,4	11,5	93,8	95,1	92,7	93,9	1,2											
Tyr	30,8	26,9	22,4	28,1	27,0	3,5	31,8	32,1	27,5	30,5	2,6											
Phe	45,5	40,7	42,4	42,8	42,8	2,0	47,8	51,0	43,7	47,5	3,7											
His	21,0	18,8	13,2	21,8	18,7	3,9	21,8	21,5	24,1	22,5	1,4											
Hil	1,0	1,8	1,6	4,3	2,2	1,5	0,0**	0,0**	0,0**	0,0**	0,0**											
Lys	40,6	70,0	49,8	66,2	56,7	13,8	74,6	78,5	73,0	75,3	2,8											
Arg	57,5	57,6	48,7	46,1	52,5	6,0	47,0	46,0	42,1	45,0	2,6											

Nota: * menos de 0,2 res/1000; ** no detectado.

Nota: * menos de 0,2 res/1000; ** no detectado.

Tabla 3. Análisis de factores de crecimiento unidos a andamios de biomatriz de conducto biliar

NOMBRE	NOMBRE COMPLETO DE LA CITOCINA	Conductos biliares humanos	Andamios de biomatriz de conducto biliar humano	%
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos básico	58299	126	0%
b-NGF	Factor de crecimiento nervioso (polipéptido beta)	516	81	16%
EGF	Factor de crecimiento epidérmico	91	108	119%
EGF R	Receptor del factor de crecimiento epidérmico	479	145	30%
FGF-4	Factor de crecimiento de fibroblastos-4	31	36	116%
FGF-6	Factor de crecimiento de fibroblastos-6	14	17	121%
FGF-7	Factor de crecimiento de fibroblastos-7	149	23	15%
GCSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos	207	233	113%
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la glía	53	49	92%
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos	108	97	90%
HB-EGF	Factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina	28	23	82%
IGFBP-1	Proteínas 1 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina	431	61	14%
IGFBP-2	Proteínas 2 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina	255	20	8%
IGFBP-3	Proteínas 3 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina	77	54	70%
IGFBP-4	Proteínas 4 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina	81	58	72%
IGFBP-6	Proteínas 6 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina	783	107	14%
IGF-I	Factor de crecimiento similar a la insulina-I	18	6	33%
IGF-I SR	Factor de crecimiento similar a la insulina-I	89	25	28%
IGF-II	Factor de crecimiento similar a la insulina-2	2873	3945	137%
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos	149	105	70%
M-CSF R	Receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos	358	71	20%
NT-3	Neurotrofina-3	71	71	100%
NT-4	Neurotrofina-4	75	58	77%
PDGF R a	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas alfa	104	63	61%
PDGF R b	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas beta	489	110	22%
PDGF-AA	Factor de crecimiento derivado de plaquetas AA	114	52	46%
PDGF-AB	Factor de crecimiento derivado de plaquetas AB	87	65	75%
PDGF-BB	Factor de crecimiento derivado de plaquetas BB	155	75	48%
PIGF	Biosíntesis de fosfatidilinositol glicano de anclaje, clase F	146	14	10%
SCF	Factor derivado de células estromales-1	39	22	56%
SCF R	Receptor del factor derivado de células estromales	159	31	19%
TGF-a	Factor de crecimiento transformante alfa	52	25	48%

TGF-b	Factor de crecimiento transformante beta	234	277	118%
TGF-b 2	Factor de crecimiento transformante beta 2	103	121	117%
TGF-b 3	Factor de crecimiento transformante beta 3	28	16	57%
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular	74	35	47%
VEGF R2	Receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular	108	33	31%
VEGF R3	Receptor 3 del factor de crecimiento endotelial vascular	45	40	89%

Tabla 4. Anticuerpos utilizados

Nombre del anticuerpo		Huésped e isotipo	Empresa	Núm. de catálogo	Dilución
Anticuerpos primarios para componentes de la matriz extracelular					
1.	colágeno 1	IgG1 de ratón	Sigma	C2456	1/2000
2.	colágeno 3A1	IgG1 de ratón	Sigma	C7805	1/2000
3.	colágeno 4A1	IgG de cabra	Santa Cruz	sc-9302	1/50
4.	colágeno 5A1	IgG de conejo	Santa Cruz	sc-20648	1/50
5.	colágeno 6	IgG de conejo	Santa Cruz	Sc-20649	1/50
6.	sulfato de condroitina	IgM de ratón	Sigma	C8035	1/200
7.	Elastina	IgG de conejo	Abcam	ab21610	1/200
8.	entactina (nidógeno 1)	IgG de rata	GeneTex	GTX72367	1/200
9.	sulfato de heparán	IgM de ratón	Seiko, Japón	270426	1/200
10.	HS-PG: perlecán	IgG2a de ratón	NeoMarkers	RT-794	1/200
11.	HS-PG: sindecano-1	IgG de cabra	R&D	AF2780	1/100
12.	Fibronectina	IgG1 de ratón	Sigma	F7387	1/200
13.	Laminina	IgG1 de ratón	Sigma	L8271	1/1000
Anticuerpos primarios para otras proteínas					
1.	AFP	IgG de conejo	Novus Biologicals	NB100-1611	1/200
2.	Albúmina	IgG de conejo	Novus Biologicals	NB 600-570	1/200
3.	ASMA	IgG2a de ratón	Sigma	A2547	1/300
4.	Ck18	IgG2b de ratón	Sigma	SAB3300016	1/400
5.	hCK19	IgG2a de ratón	Abcam	ab7754	1/250
6.	CK19	IgG de conejo	Abcam	Ab52625	1/200
7.	CYP3A4	IgG de ratón	Abnova	H00001576-B01P	1/200
8.	Desmina	IgG de conejo	Abcam	Ab8592	1/200
9.	EpCAM	IgG1 de ratón	NeoMarkers	MS-181	1/200
10.	receptor de secretina	IgG de conejo	Santa Cruz	sc-26633	1/100
11.	PAN CK	IgG1 de ratón	Abcam	ab-7753	1/300
12.	Tubulina-a	IgG1 de ratón	Neomarkers	MS-581	1/1000
13.	Vimentina	IgG1 de ratón	Abcam	Ab8978	1/200
Anticuerpos secundarios o colorantes para la tinción de células por fluorescencia o inmunohistoquímica de tejidos					
1.	anti-IgG 1 o 2a de ratón o anti-IgG de conejo en cabra conjugado con Alexa Fluor® 488/594			Molecular Probes	1/500
2.	Sistema ABC VECTASTAIN®			Vector Laboratories	
3.	KIT DE SUSTRATO NovaRED™			Vector Laboratories	
4.	Faloidina 488			Molecular Probes	1/500

Tabla 5. Cebadores utilizados para RT-PCR

Núm.	Nombre	Nombre completo	Acceso del GenBank	Secuencia (5' -> 3')	Tm	Tamaño del amplicón
1	CXCR-4	receptor 4 de quimiocinas (motivo C-X-C)	<u>AJ224869</u>	TACACCGAGGAAATGGGCTCA AGATGATGGAGTAGATGTGGG	63 60,4	112
2	EpCAM	molécula de adhesión celular epitelial	<u>NM_002354</u>	ATAACCTGCTCTGAGCGAGTG TGAAGTGCAGTCCGCAAACT	61,6 62,3	104
3	KRT19	queratina 19	<u>NM_002276</u>	ACCAAGTTTGAGACGGAACAG CCCTCAGCGTACTGATTTCT	60,2 61,3	181
4	HNF6	factor nuclear 6 de hepatocitos, alfa	<u>NM_004498</u>	ATGTGGAAGTGGCTGCAGGA TGTGTTGCCCTCTATCCTTCCC	60,7 61,2	105
5	FOXA2	caja forkhead A2	<u>NM_021784</u>	GCGACCCCAAGACCTACAG GGTTCTGCCGCTAGAAAGG	61,7 61,7	162
6	PROX1	caja homeótica 1 de prospero	<u>NM_002763</u>	CTTGACACAAAAAGCCCACT GGGATGCCCTTCTTGCTATCTCAT	61 61,8	100
7	AFP	alfa fetoproteína	<u>NM_001134</u>	RRRRFXXXFFXRXRRR ACAGGCAGGCAGCTTTATCAG	61,9 61,8	138
8	ALB	albúmina	<u>M12523</u>	CCTCCTACCTTGATTGCATCAG TTTTGACCCCATAGAAGCTCTGCC	61,4 62,4	90
9	TF	transferrina	<u>NM_001063</u>	AAGTCGCCTCGAAGATACACA AAGGAGAGAAACACTGCTCGTG	60,2 60	137
10	CYP3A4	citocromo P450, familia 3, subfamilia A, polipéptido 4	<u>NM_017460</u>	TTTGGACCCCTGTACCATTGT GCATTGGACTTGAGGAAGCTC	60,9 61,7	174
11	TAT	tirosina aminotransferasa	<u>NM_000353</u>	TTTGGACCCCTGTACCATTGT GCATTGGACTTGAGGAAGCTC	61 61	102
12	G6PC	glucosa-6-fosfatasa, subunidad catalítica	<u>NM_000151</u>	TCAGGGAAGATAAAGCCGACC AGGTAGATTCTGTACAGACAGAC	61,8 61,1	105

(Continuación)

13	CFTR	regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis cística	<u>NM_000492</u>	AAAAGGCCAGCGTTGTCTCC TGAAGCCAGCTCTCTATCCCA	63 62,1	170
14	GGT1	gamma glutamiltransferasa	<u>J05235</u>	GGGGAGATCGAGGGCTATGAG CTAGACGGTCCGCTTGTTTC	63 61,8	150
15	AE2	SLC4A2	<u>NM_003040</u>	GCCAAGGGCGCAGATTCTT CCAGGGTGCGGTGAAGTTC	63 62,9	103
16	ASBT	SLC10A2	<u>NM_000452</u>	TGTGTTGGCCTTCCCTCTGTCAG GGCAGCATCCTATAATGAGCAC	62 60,9	115
17	GAPDH	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	<u>NM_002046</u>	CATGAGAAAGTATGACAAACAGCCT AGTCCTTCCACGATACCAAAGT	60 60,8	113

Tabla 6. Análisis de factores de crecimiento unidos a los andamios de biomatriz de hígado

Nombre	Nombre completo de la citocina	Hígados de rata	Andamios de biomatriz de rata	Porcentaje
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos básico	100,06	394,14	394
EGF	Factor de crecimiento epidérmico	74,81	76,02	102
EGF R	Receptor del factor de crecimiento epidérmico	92,81	81,64	88
FGF-4	Factor de crecimiento de fibroblastos-4	15,06	13,21	88
FGF-6	Factor de crecimiento de fibroblastos-6	4,81	3,7	78
FGF-7	Factor de crecimiento de fibroblastos-7	10,06	6,32	63
GCSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos	348,06	338,20	97
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la glía	81,31	43,59	54
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos	133,56	105,38	79
HB-EGF	Factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina	44,56	38,23	86
IGFBP-1	Proteínas 1 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina	67,81	70,40	104
IGFBP-3	Proteínas 3 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina	140,81	201,90	143
IGFBP-4	Proteínas 4 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina	83,56	58,92	71
IGFBP-6	Proteínas 6 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina	91,81	72,19	79
IGF-I	Factor de crecimiento similar a la insulina-I	1,56	1,98	127
IGF-I SR	Factor de crecimiento similar a la insulina-I	7,31	3,51	48
IGF-II	Factor de crecimiento similar a la insulina-2	3749,06	3482,52	93
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos	170,31	134,68	79
M-CSF R	Receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos	70,56	50,47	72
NT-3	Neurotrofina-3	25,56	5,03	20
NT-4	Neurotrofina-4	55,06	43,59	79
PDGF R a	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas alfa	10,56	21,11	200
PDGF R b	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas beta	113,81	85,46	75
PDGF-AA	Factor de crecimiento derivado de plaquetas AA	62,06	106,40	171
PDGF-AB	Factor de crecimiento derivado de plaquetas AB	19,31	19,34	100
PDGF-BB	Factor de crecimiento derivado de plaquetas BB	9,56	14,23	149
PIGF	Biosíntesis de fosfatidilinositol glicano de anclaje, clase F	4,81	8,36	174
SCF	Factor derivado de células estromales-1	2,06	42,56	2064
SCF R	Receptor del factor derivado de células estromales	17,06	17,80	104
TGF-a	Factor de crecimiento transformante alfa	21,31	21,63	102
TGF-b	Factor de crecimiento transformante beta	330,31	342,77	104
TGF-b 2	Factor de crecimiento transformante beta 2	134,06	152,34	114
TGF-b 3	Factor de crecimiento transformante beta 3	1,06	0,18	17
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular	70,56	94,14	133
VEGF R2	Receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular	13,56	11,93	88
VEGF R3	Receptor 3 del factor de crecimiento endotelial vascular	459,56	46,91	10

Tabla 7. Propiedades de las células madre hepáticas humanas (hHpSC) después del aislamiento y en cultivo

Propiedades	hHpSC recién aisladas	Condiciones de autorreplicación (Día 12)	Condiciones de diferenciación (Día 12)	
		KM y TCP o colágeno tipo III	DM y colágeno tipo I	DM y andamios de biomatriz
Tiempo hasta la adhesión	-----	~ 4-5 horas en TCP; ~ 3 horas en colágeno tipo III	7-12 horas	~ 3 horas
% de adhesión de células viables	----	60-80 % en TCP y ~ 100 % en colágeno tipo III	~ 100 %	
Morfología de las colonias		colonias en 2 dimensiones (monocapa)	Cordones de células; algo cuboidal	Cordones de células; muy tridimensionales
Tiempo de duplicación (tasa de división)	----	Una división cada ~ 36 h en TCP y ~ 24-26 horas en colágeno tipo III	Una división cada ~ 40-50 horas que transita hasta la detención del crecimiento en 7-10 días	Solo algunas divisiones que transitan hasta la detención del crecimiento en ~ 5 días
Duración de la viabilidad		>6 meses (que permanecen como células madre)	~ 2 semanas	>8 semanas como células diferenciadas (no se evaluaron todavía durante más tiempo)
	Porcentaje de células que expresan el marcador especificado			
EpCAM	100%		Presente en membranas de colangiocitos pequeños; sin expresión en absoluto en hepatocitos maduros	
NCAM	>80%		Ninguno	
CD133/1	90%		Ninguno	
SOX 17	100%		Ninguno	
CK 8/18, E-cadherina	100%		100%	
CK19	90%		Presente en colangiocitos pero no en hepatocitos	
a -fetoproteína	Ninguno; si hay, se debe a la contaminación con hepatoblastos		Expresión moderada en la mayoría de las células a los 10-12 días	La expresión en los primeros 2-3 días, disminuye drásticamente después de eso, sin expresión del día 7 en adelante.
P450	Ninguno o niveles insignificantes		100 % (~ 18 000 RLU)*	100 % (~ 35 000 RLU)*
Urea sintetizada	Ninguno		~ 2,5 mg/dl	~ 7 mg/dl
Marcadores: hepatocitos maduros	La mayoría de las células no tienen ninguno; las que expresan lo hacen de manera muy débil (por ejemplo, albúmina); todas expresan ARNm de transferrina pero no la proteína transferrina		albúmina, proteína transferrina, tirosina aminotransferasa (TAT), glucógeno. Niveles débiles en colágeno I frente a fuertes en andamios de biomatriz	
Marcadores: colangiocitos maduros	La mayoría ninguno; las que expresan alguno lo hacen de manera muy débil: (por ejemplo, CFTR, GGT1, AE2: sin expresión de ASBT y acuoporinas tardías)		Receptor de secretina, EA2, ABAT, CFTR, GGT1, AE2, ASBT, pero con niveles débiles en colágeno I frente a muy fuertes en andamios de biomatriz	
KM = medio de Kubota, un medio libre de suero usado para hHpSC y progenitoras; HDM-L = medio de diferenciación derivado de KM y con hormonas y factores proporcionados en los métodos. TCP = plástico de cultivo de tejidos. *Ver la Figura 5F; **Ver la Figura 5E				

Tabla 8. Volúmenes de biomatriz a dispersar para placas de múltiples pocillos

Tamaño de la placa	Volumen/pocillo	Volumen/Placa	Placas/Frasco
384 pocillos	30 ul	12,0 ml	10
96 pocillos	50 ul	5,0 ml	24
24 pocillos	300 ul	7,5 ml	16
12 pocillos	800 ul	10 ml	12
6 pocillos	1,5 ml	9 ml	13

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Carolina del Norte en Chapel Hill
 GigaCyte, LLC
 Roach, Marsha Lynn
 20 Malavarca, Richard Harold
 Wang, Yunfang
 Reid, Lola Cynthia McAdams

<120> ANDAMIOS DE BIOMATRIZ PARA LA DISPERSIÓN A ESCALA INDUSTRIAL

<130> 5470-560WO2

<150> US 61/360,939

<151> 2010-07-02

<160> 34

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador de RT-PCR

<400> 1
 tacaccgagg aaatgggctc a 21

<210> 2
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador de RT-PCR

<400> 2
 agatgatgga gtagatgggtg gg 22

<210> 3
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador de RT-PCR

<400> 3
 ataacctgct ctgagcgagt g 21

5 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR

 10 <400> 4
 tgaagtgcag tccgcaaact 20

 <210> 5
 <211> 21
 15 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR
 20
 <400> 5
 accaagtttg agacggaaca g 21

 <210> 6
 25 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 30 <223> Cebador de RT-PCR

 <400> 6
 ccctcagcgt actgattcc t 21

 35 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR

 <400> 7
 45 atgtggaagt ggctgcagga 20

 <210> 8
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR

 <400> 8
 55 tgtgttgccct ctatcctcc c 21

 <210> 9
 <211> 19
 <212> ADN
 60 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR

 65 <400> 9
 gcgaccccaa gacctacag 19

5 <210> 10
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR
 10 <400> 10
 ggttctgccg gtagaagg 19
 <210> 11
 <211> 23
 15 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR
 20 <400> 11
 ttgacattgg agtgaaaagg acg 23
 <210> 12
 25 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> Cebador de RT-PCR
 <400> 12
 tgctcagaac cttggggatt c 21
 35 <210> 13
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR
 <400> 13
 45 cttgcacaca aaaagcccac t 21
 <210> 14
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR
 <400> 14
 55 gggatgcctt cttgctatct cat 23
 <210> 15
 <211> 21
 <212> ADN
 60 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR
 65 <400> 15
 tttatgcccc ggaactcctt t 21

5 <210> 16
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR

 10 <400> 16
 acaggcaggc agctttatca g 21

 <210> 17
 <211> 22
 15 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR
 20 <400> 17
 cctcctacct tgattgcatc ag 22

 <210> 18
 25 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 30 <223> Cebador de RT-PCR

 <400> 18
 ttttgaccca tagaactctg cc 22

 35 <210> 19
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR

 <400> 19
 45 aagtcgcctc gaagatacac a 21

 <210> 20
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR

 <400> 20
 55 aaggagagaa cactgctcgt g 21

 <210> 21
 <211> 21
 <212> ADN
 60 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR

 65 <400> 21
 tttgggaccc tgtaccattg t 21

<210> 22
 <211> 21
 <212> ADN
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR

 10 <400> 22
 gcattggact tgaggaagct c 21

 <210> 23
 <211> 22
 15 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR
 20
 <400> 23
 tcagggaaag ataaagccga cc22

 <210> 24
 25 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 30 <223> Cebador de RT-PCR

 <400> 24
 aggtagattc gtgacagaca gac 23

 35 <210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR

 <400> 25
 45 aaaaggccag cggtgtctcc 20

 <210> 26
 <211> 21
 <212> ADN
 50 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR

 <400> 26
 55 tgaagccagc tctctatccc a 21

 <210> 27
 <211> 21
 <212> ADN
 60 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR

 65 <400> 27
 ggggagatcg agggctatga g 21

<210> 28
 <211> 21
 <212> ADN
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR

 10 <400> 28
 gatgacgggc cgctgtttt c 21

 <210> 29
 <211> 19
 15 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR
 20
 <400> 29
 gccaagggcg cagattctt 19

 <210> 30
 25 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 30 <223> Cebador de RT-PCR

 <400> 30
 ccagggtgcg gtgaagttc 19

 35 <210> 31
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR

 <400> 31
 45 tgtgttggt tcctctgtca g 21

 <210> 32
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR

 <400> 32
 55 ggcagcatcc tataatgagc ac 22

 <210> 33
 <211> 23
 <212> ADN
 60 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR

 65 <400> 33
 catgagaagt atgacaacag cct23

ES 2 791 312 T3

<210> 34
<211> 22
<212> ADN
5 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador de RT-PCR

10 <400> 34
agtccttcca cgatacaaaa gt 22

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un andamio de biomatriz a partir de tejido biológico seleccionado del grupo que comprende: páncreas, árbol biliar y duodeno para la dispersión a escala industrial sobre un aparato de cultivo, que comprende:
a) perfundir el tejido biológico u homogeneizar el tejido biológico con un tampón que comprende una concentración de sal de 3,5 M de NaCl a 4,5 M de NaCl, después
b) perfundir el tejido biológico o extraer el homogeneizado de la etapa (a) con un tampón deslipidante que comprende desoxicolato de sodio y fosfolipasa A2 en un primer medio, en donde la osmolalidad de dicho primer medio es de 250 mOsm/kg a 350 mOsm/kg y dicho primer medio está libre de suero y a pH neutro; después
c) perfundir el tejido o extraer el homogeneizado de la etapa (b) con un tampón a un pH neutro y que comprende una concentración de sal de 2,0 M de NaCl a 5,0 M de NaCl, la concentración elegida para mantener insolubles los colágenos identificados en el tejido biológico; después
d) perfundir el tejido o extraer el homogeneizado de la etapa (c) con RNasa y DNasa en un tampón; y después
e) enjuagar el tejido u homogeneizado de la etapa (d) con un segundo medio que está a pH neutro, está libre de suero y tiene una osmolalidad de 250 mOsm/kg a 350 mOsm/kg;
f) diluir el andamio de biomatriz en medio basal;
g) congelar el andamio de biomatriz de (f);
h) pulverizar el andamio de biomatriz de (g) mediante trituración criogénica en partículas de biomatriz que varían en tamaño de 1 µm a 100 µm;
i) descongelar las partículas de biomatriz de (h) en suspensión en medio basal; y
j) dispersar las partículas de biomatriz de la etapa (i) sobre un aparato de cultivo.
2. El método de la reivindicación 1 en donde el tejido biológico es de mamífero.
3. El método de cualquier reivindicación anterior, que comprende además la etapa de esterilizar el andamio de biomatriz, opcionalmente en donde la etapa de esterilización se lleva a cabo por irradiación gamma.
4. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde el andamio de biomatriz de (f) se diluye a una relación 1:6 en el medio basal.
5. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde las partículas de biomatriz de (i) se diluyen a una relación 1:24 en el medio basal.
6. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde el primer medio comprende sales, minerales, aminoácidos, vitaminas y azúcares.
7. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde el primer medio es un medio basal, opcionalmente en donde el medio basal se selecciona del grupo que consiste en RPMI 1640, DME/F12, DME, F12, medio de Waymouth y medio de William.
8. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde el segundo medio comprende al menos uno de los constituyentes presentes en el líquido intersticial.
9. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde el tampón deslipidante de la etapa (b) comprende de 20 unidades/l a 50 unidades/l de fosfolipasa A2 y desoxicolato de sodio al 1 % en el primer medio.
10. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde la concentración de sal del tampón de la etapa (c) es de 3,4 M de NaCl a 3,5 M de NaCl cuando se usa para la preparación de andamios a partir de un hígado adulto y es de 4,0 M de NaCl a 4,5 M de NaCl cuando se usa para la preparación de andamios a partir de un hígado fetal.
11. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde el tampón de la etapa (c) comprende, además, un inhibidor de proteasas, opcionalmente en donde el inhibidor de proteasas es un inhibidor de tripsina de soja.
12. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde el tampón de la etapa (d) comprende, además, un inhibidor de proteasas, opcionalmente en donde el inhibidor de proteasas es un inhibidor de tripsina de soja.
13. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde todos los medios y tampones de las etapas (a) a la (e) están libres de una cantidad detectable de una enzima que degrada los componentes de la matriz extracelular.

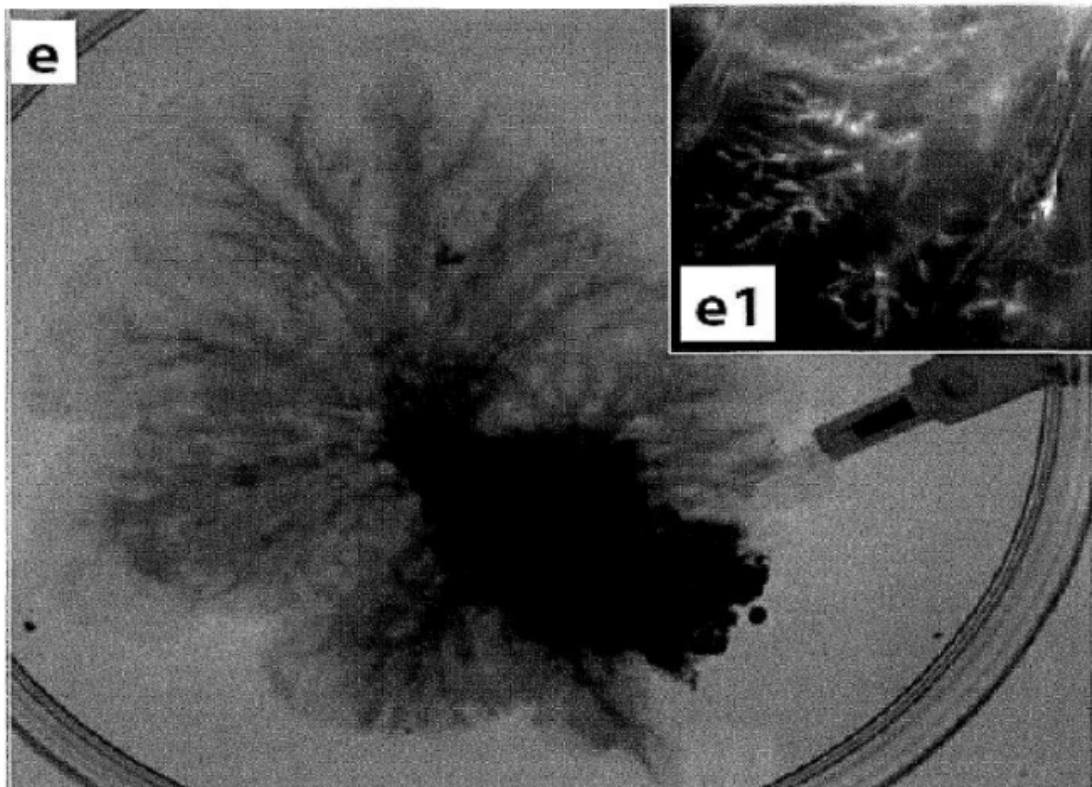
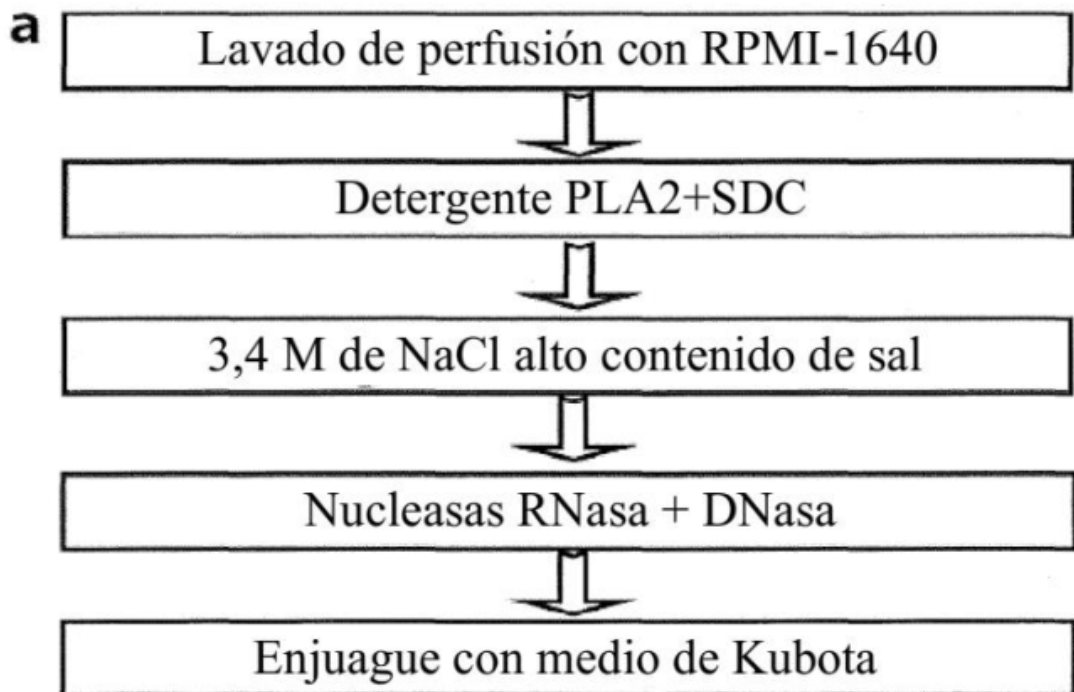


FIGURA 1

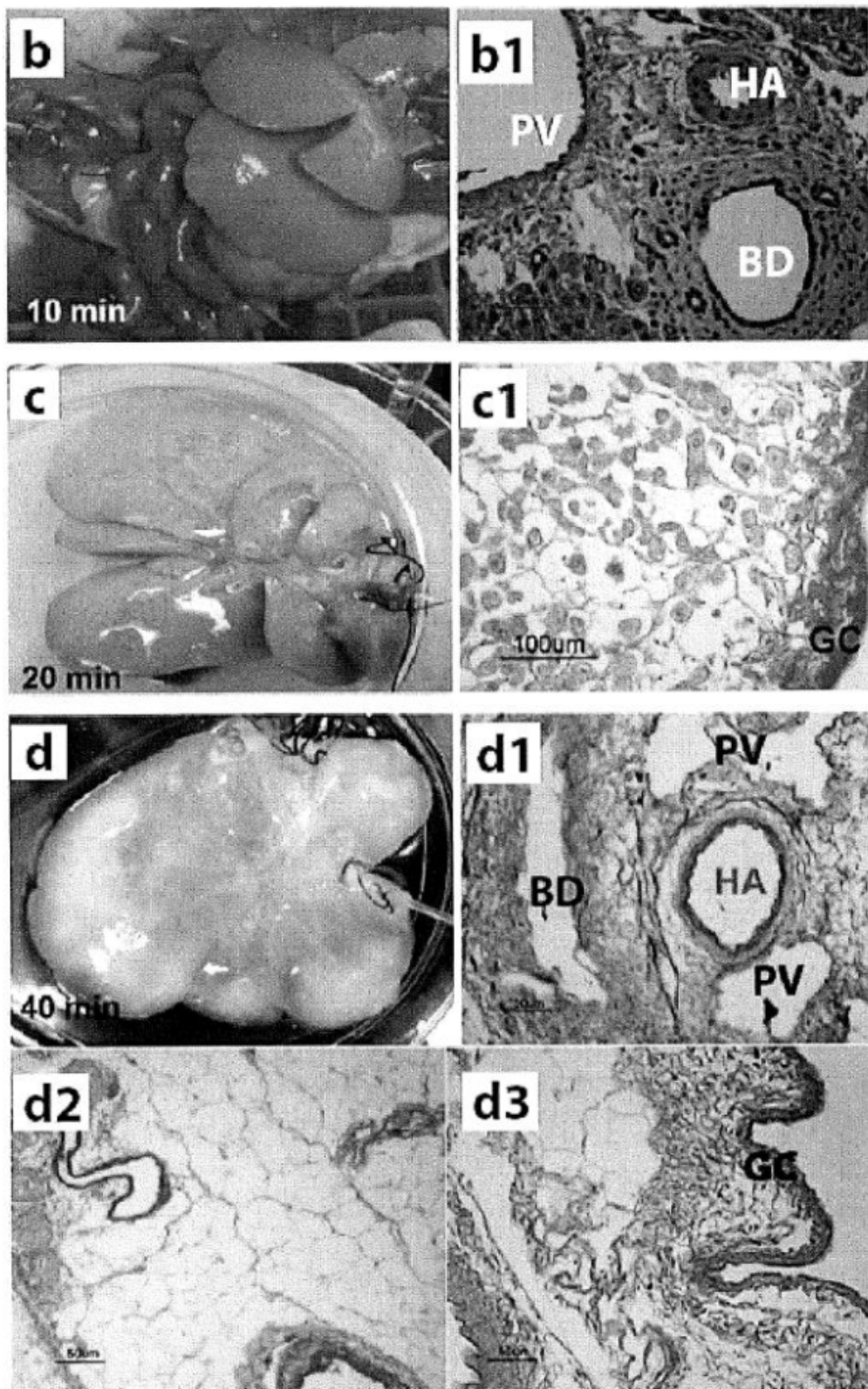


FIGURA 1 (continuación)

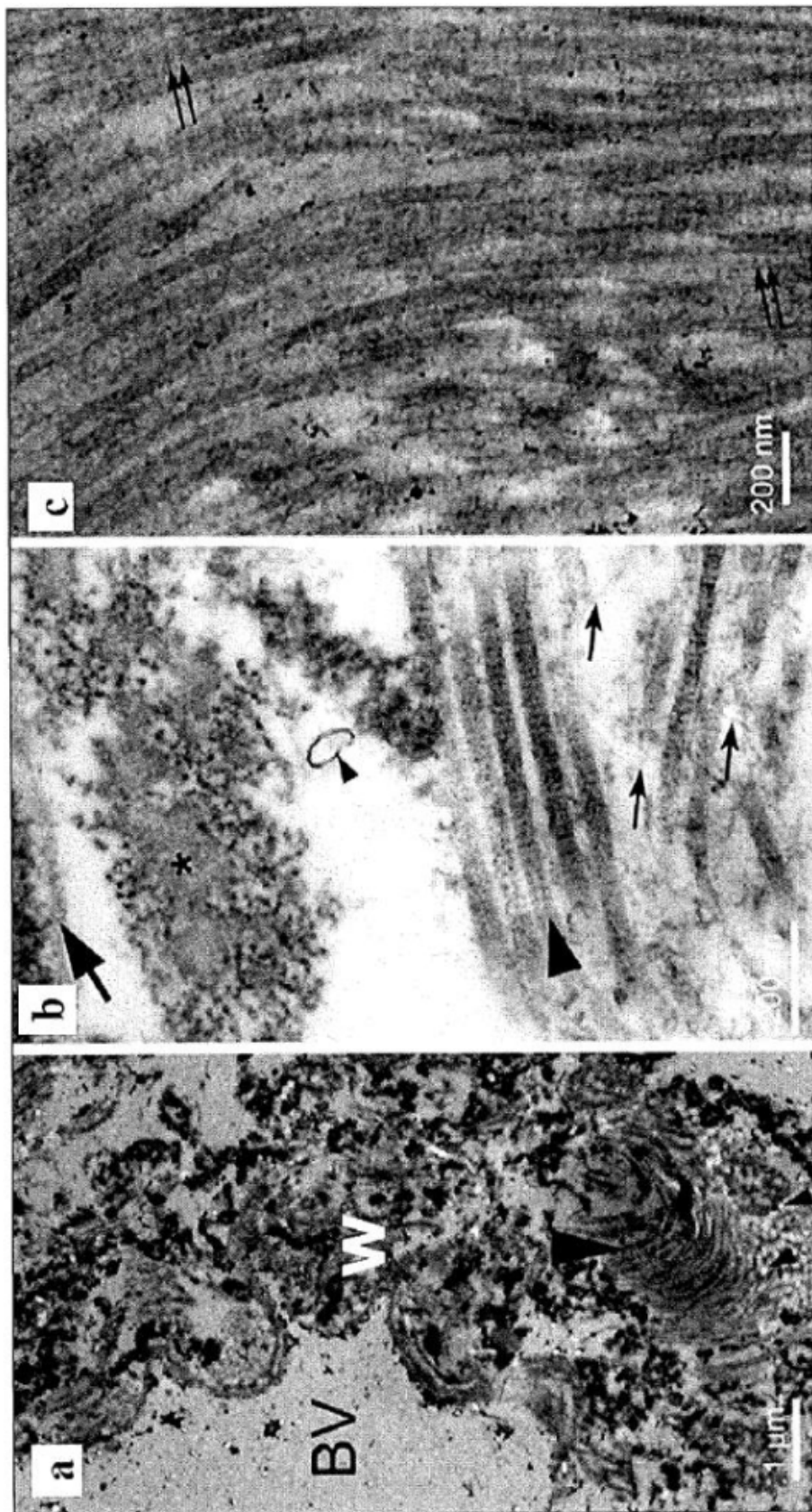


FIGURA 2

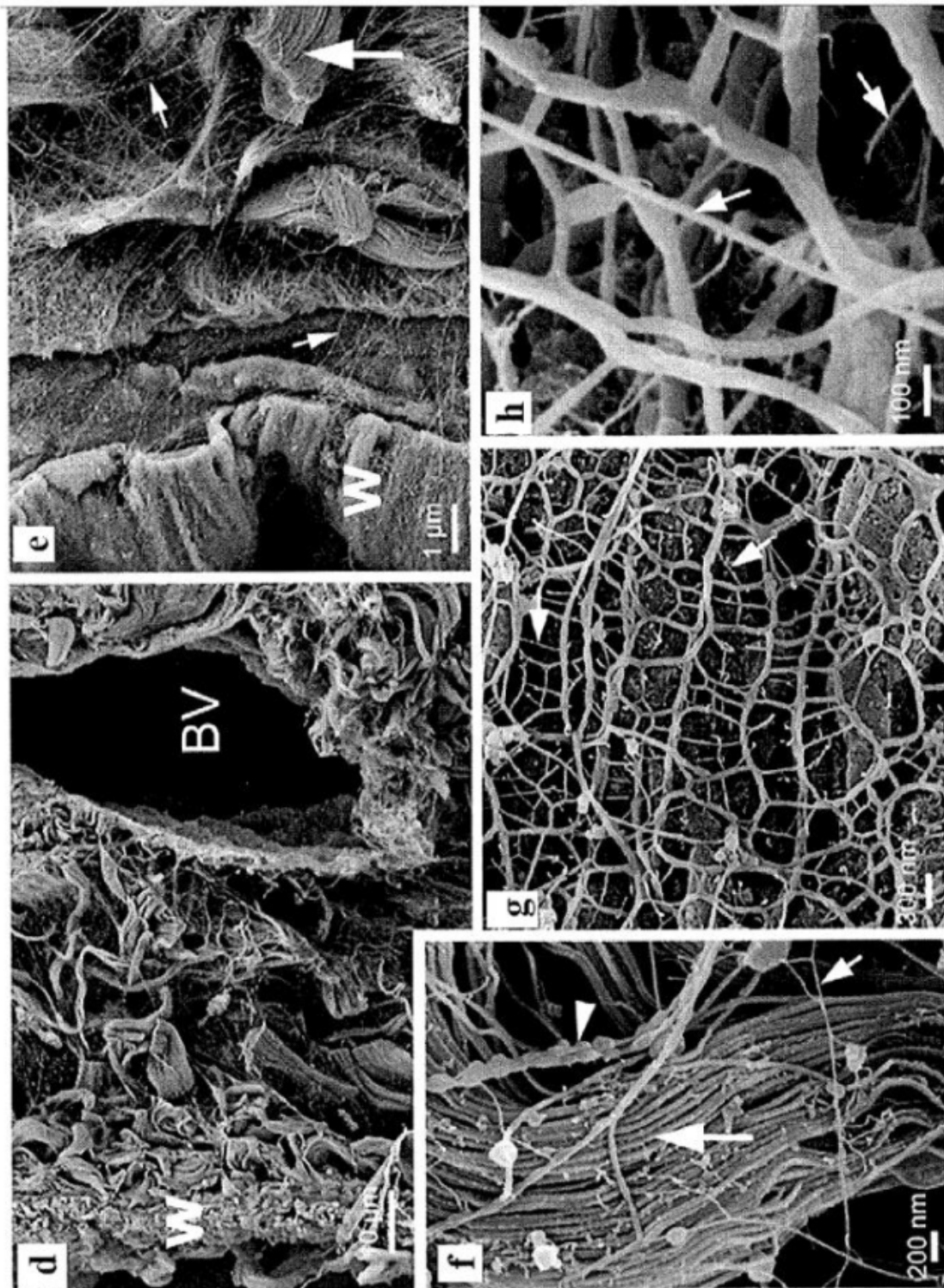


FIGURA 2 (continuación)

a

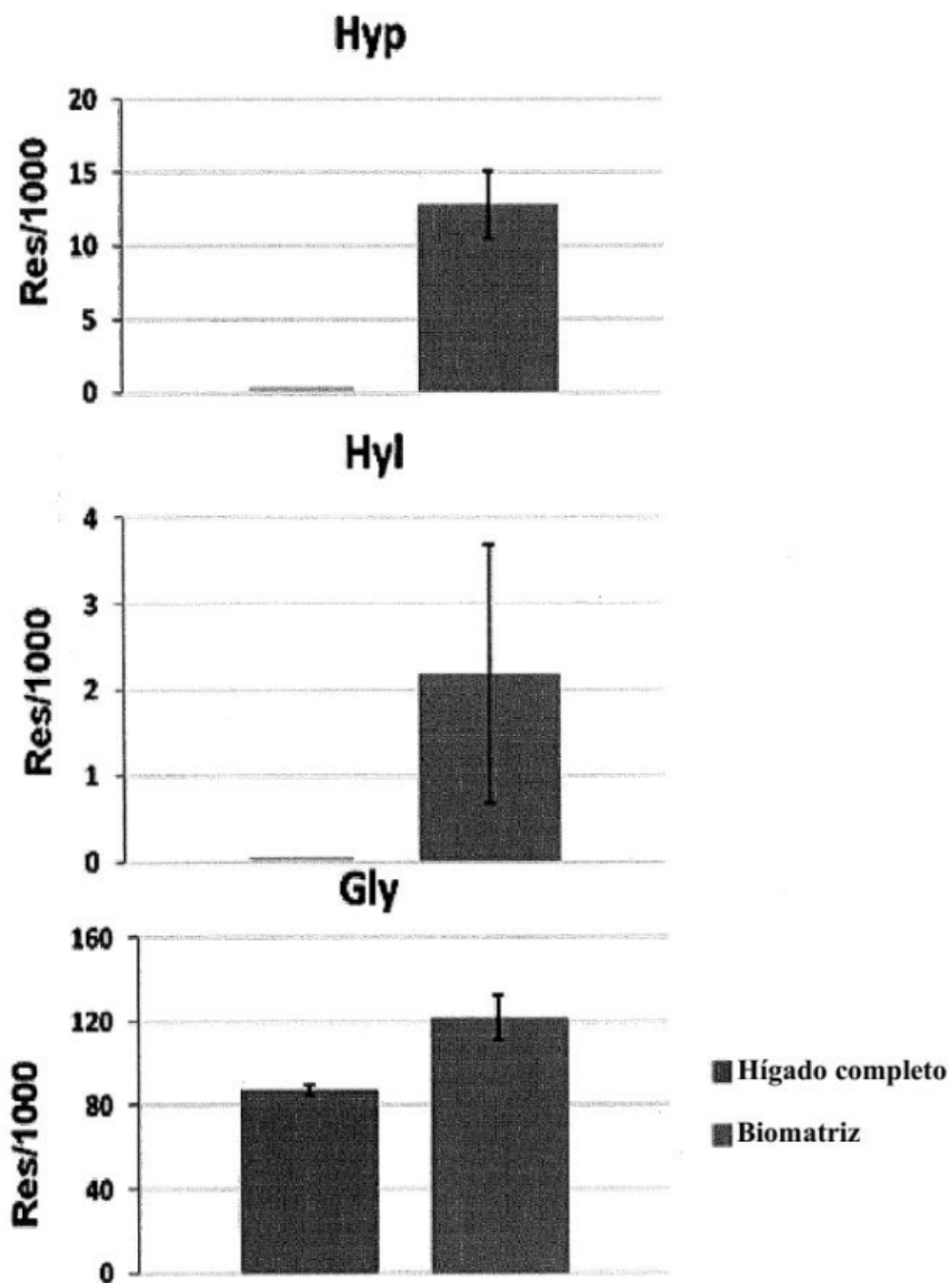


FIGURA 3

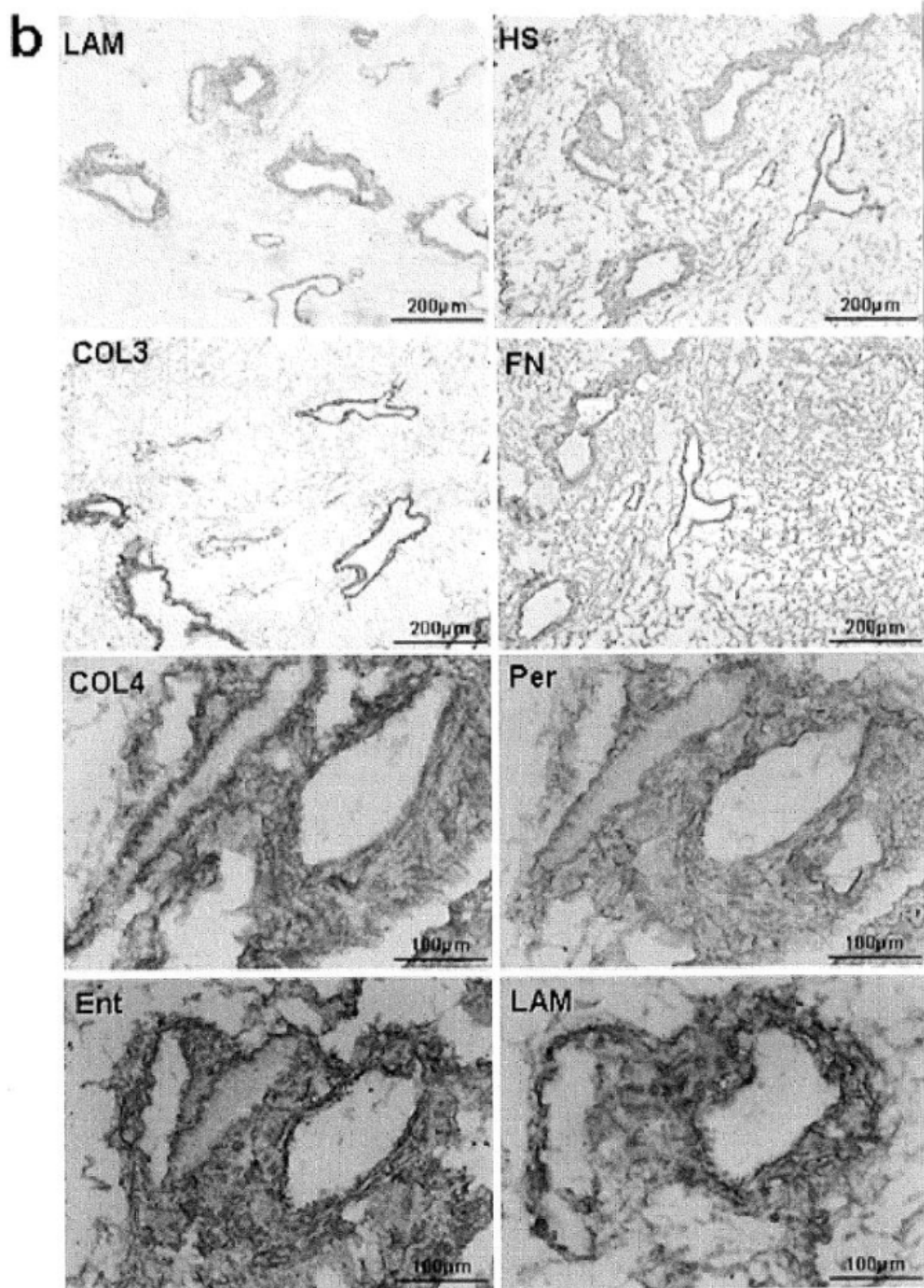


FIGURA 3 (continuación)

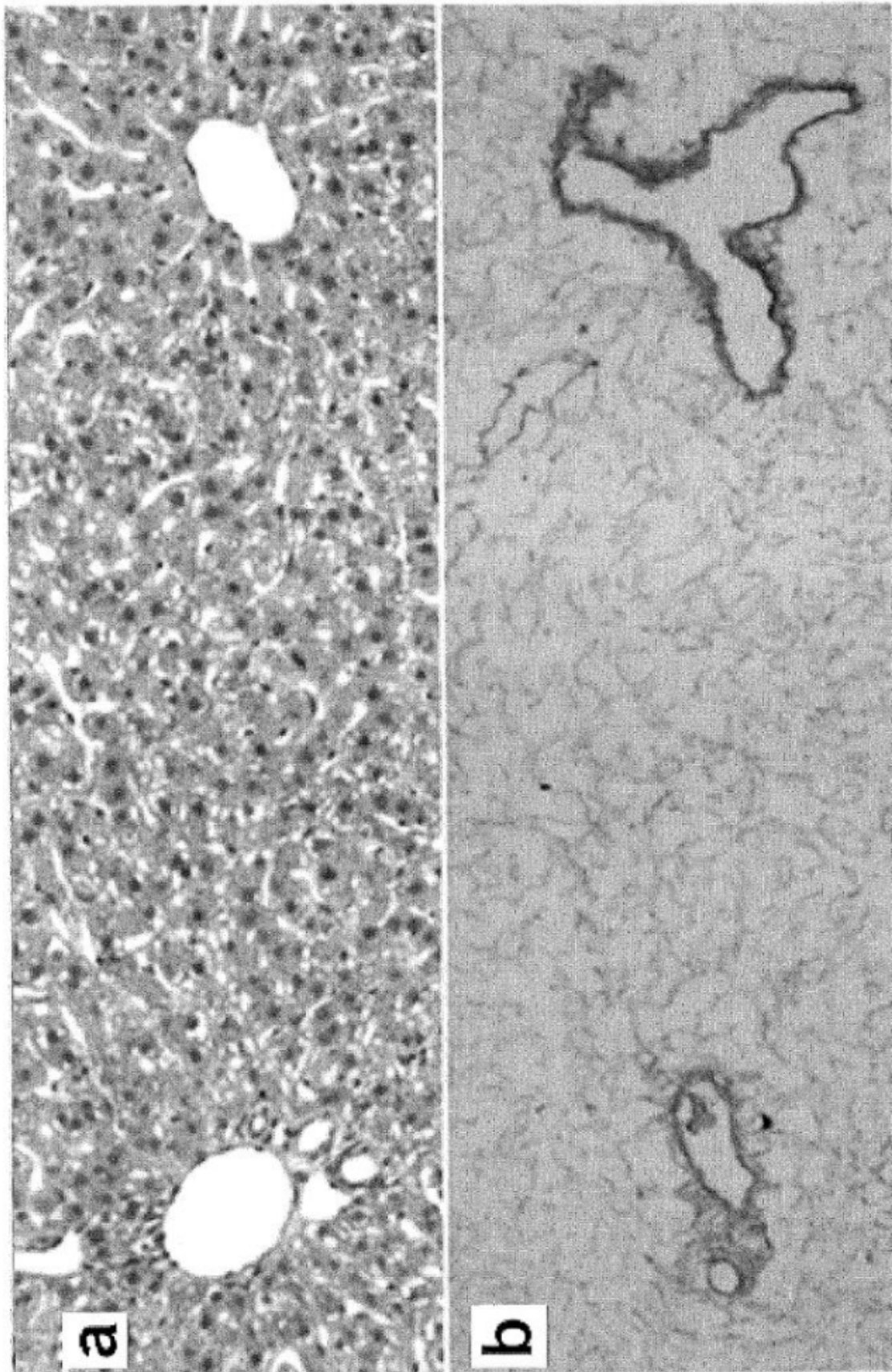


FIGURA 4

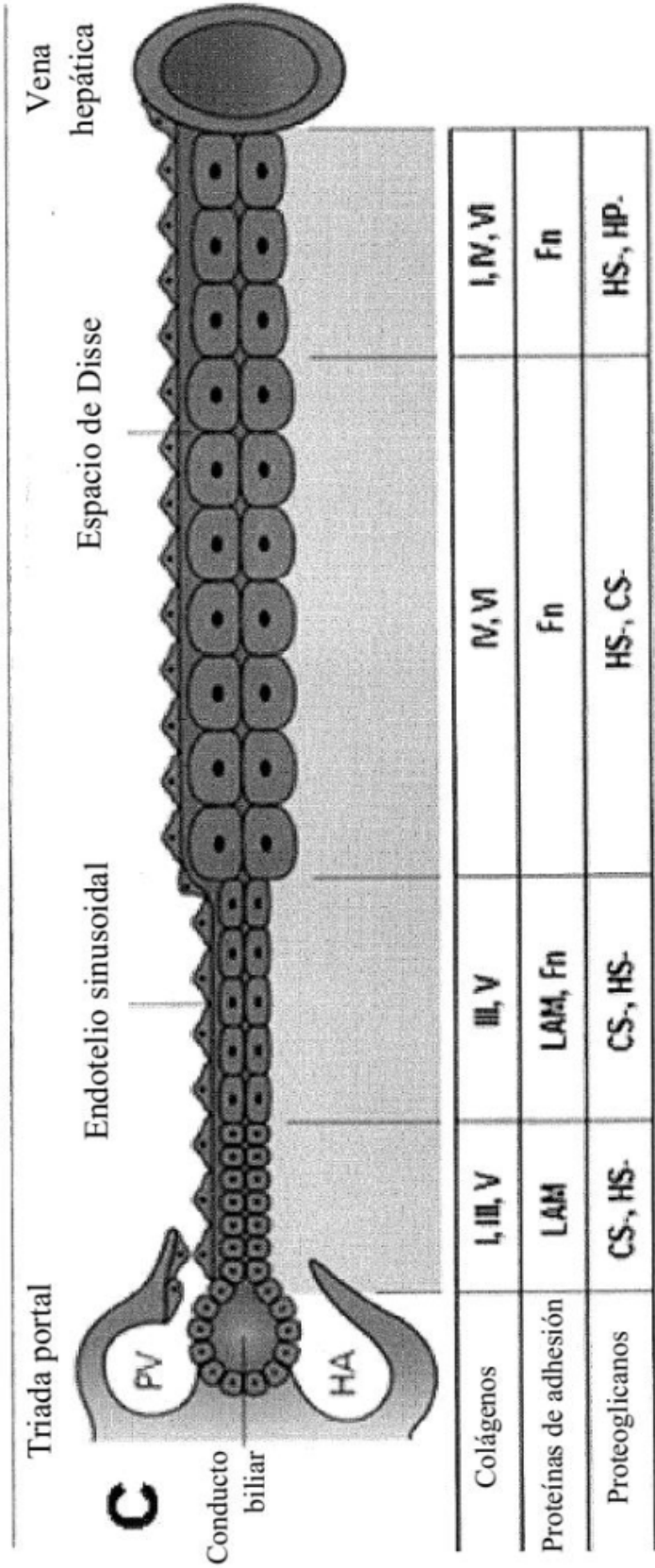


FIGURA 4 (continuación)

d Componente de la matriz			Hígado (in vivo)	Andamios de biomatriz
Colágenos	Fibrilar	Tipo I	Cápsula de Glisson, triadas portales y puntos de cordones hepáticos	Triadas portales y región acinar media
		Tipo III	Triadas portales, placas ductales, canales de Hering, armazón de reticulina de los sinusoides	En todo el andamio, especialmente alrededor de las triadas portales y restos de pared de células parenquimales
		Tipo V	Alrededor de las triadas portales y puntos de cordones hepáticos	Triadas portales y región acinar media
	Membrana basal	Tipo IV	Alrededor de las triadas portales y la vena central, entre el parénquima y el endotelio en el espacio de Disse	Triadas portales y alrededor de los restos de vasculatura
		Tipo VI	Triadas portales y alrededor de la vasculatura	Triadas portales y alrededor de los restos de vasculatura
Proteínas de adhesión	Membrana basal	Laminina	Triadas portales	Triadas portales
		Nidógeno	Alrededor de la vasculatura	Triadas portales y alrededor de los restos de vasculatura
	otros	Fibronectina	En todas las placas hepáticas como filamentos delgados	En todos los andamios de matriz; especialmente alrededor de los restos de pared de células parenquimales
		Elastina	Particularmente evidente alrededor de la vasculatura y la cápsula de Glisson	Ondas de elastina cerca de los restos de vasos sanguíneos
Proteoglicanos		Vimentina	Particularmente evidente alrededor de la vasculatura	En todos los andamios de matriz, especialmente alrededor de los restos de vasculatura
		Hialuronano	Alrededor de la triada portal y el área adyacente	---
		CS-PG	Predominantemente periportal	Predominantemente periportal
		HS-PG (glicanos, sindecanos)	Distribución radial que rodea la vena central y a través de las vasculaturas sinusoidales. No se encuentra alrededor de las triadas portales.	En toda la matriz y alrededor de la vasculatura
		HS-PG (Perlecán)	Más evidente alrededor de las triadas portales (en espacios fuera de los sinusoides)	Predominantemente alrededor de las triadas portales
		HP-PG	Predominantemente alrededor de las venas centrales*	n.d.

FIGURA 4 (continuación)

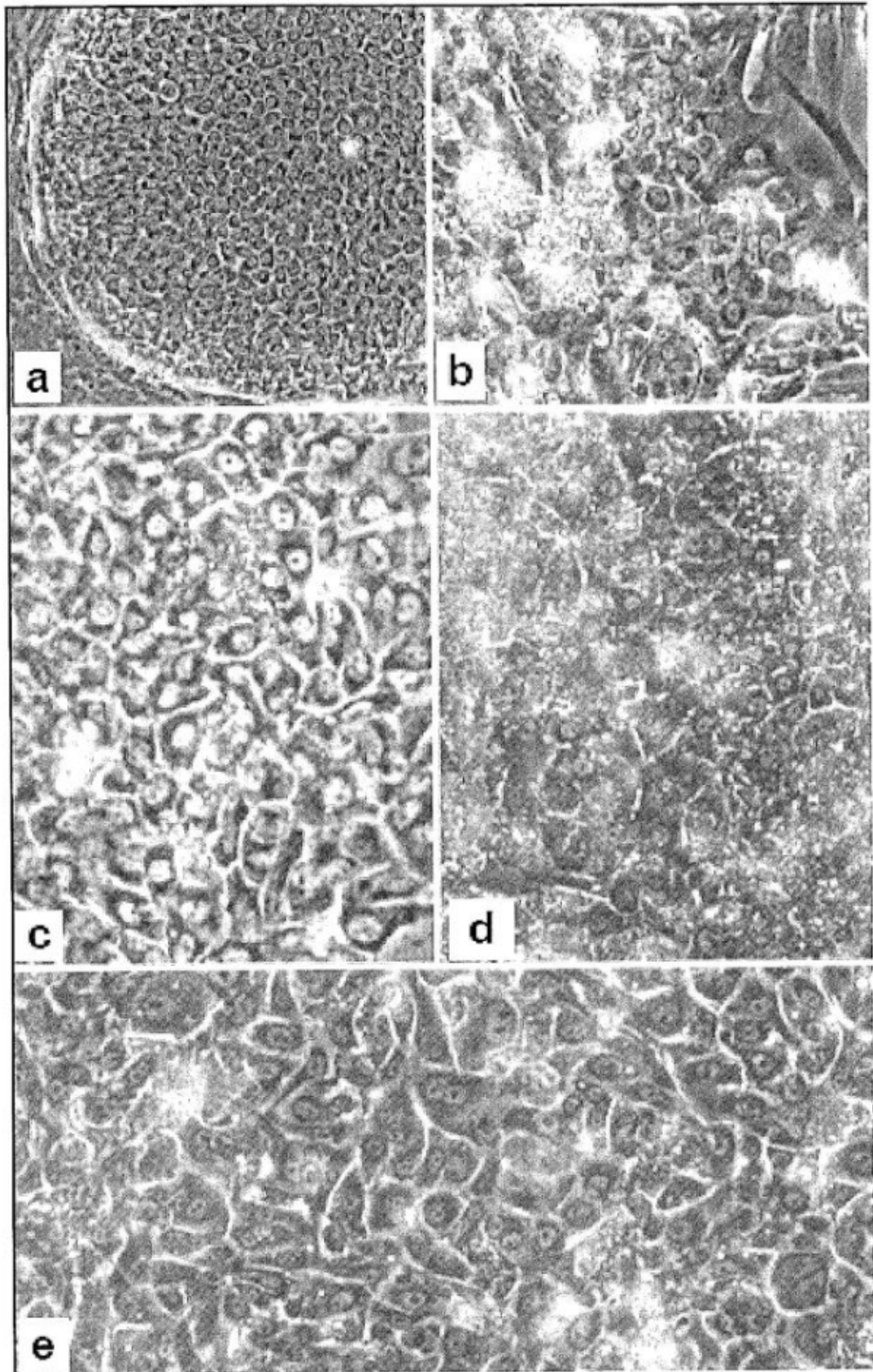


FIGURA 5

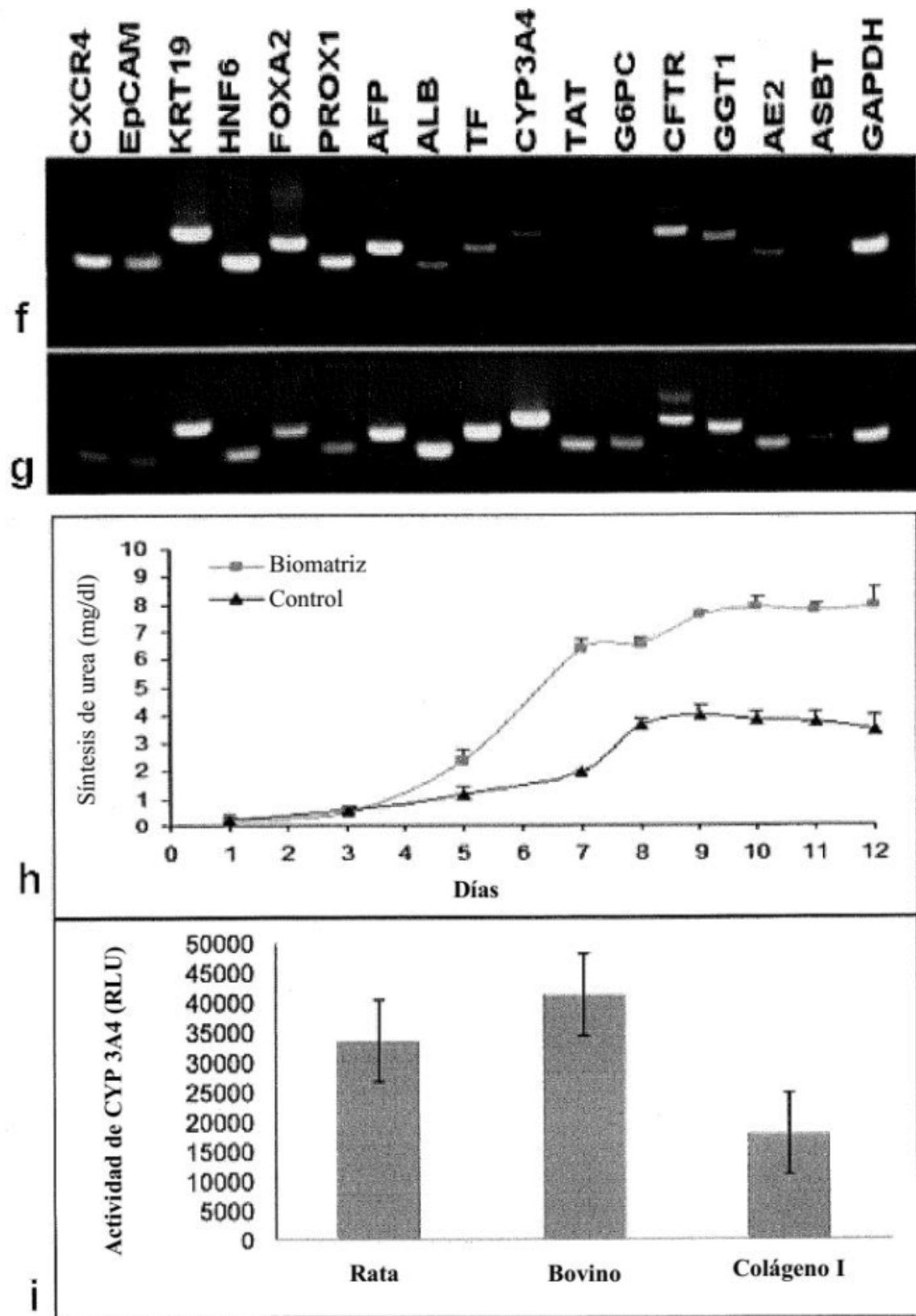


FIGURA 5 (continuación)

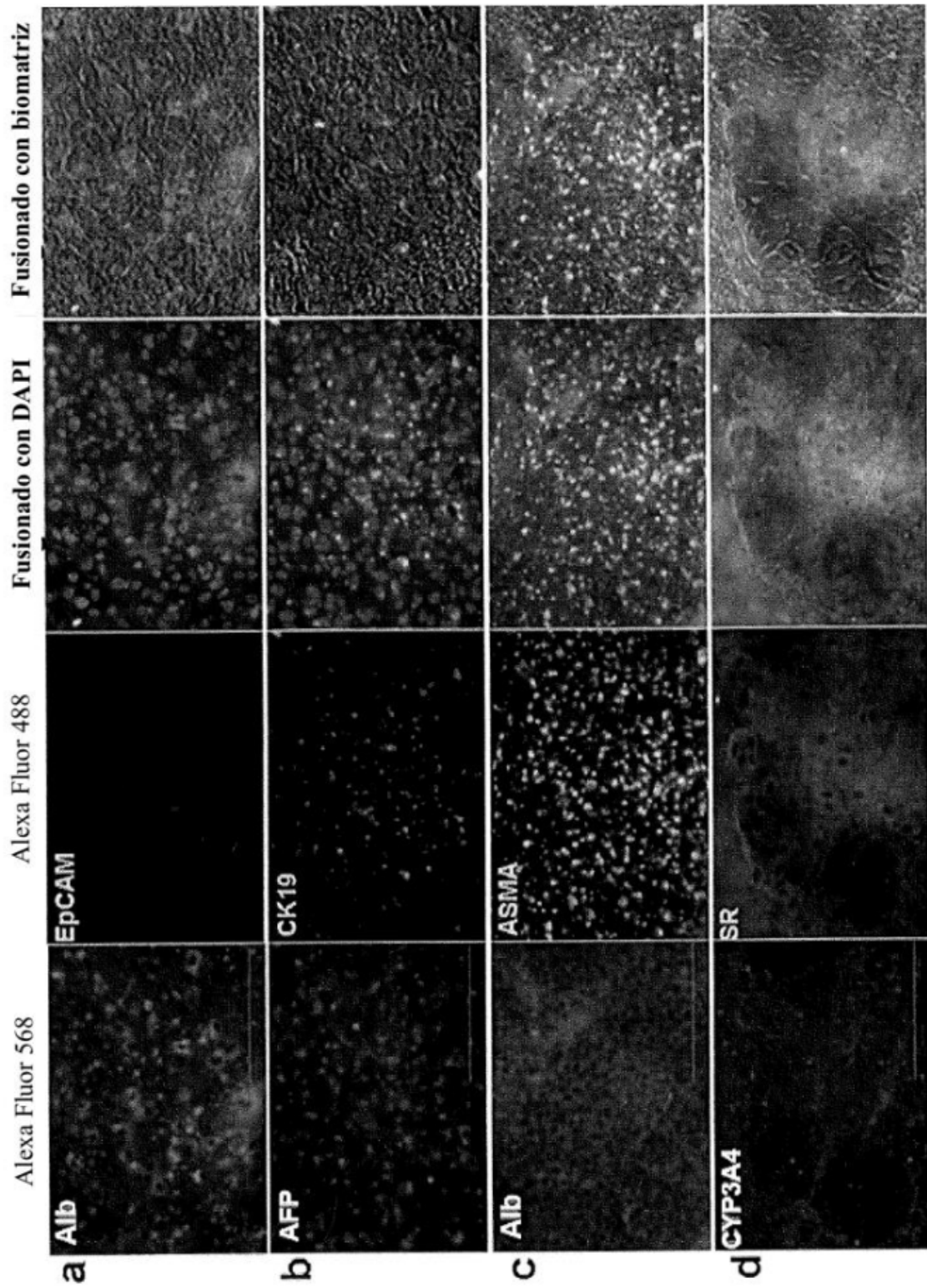


FIGURA 6

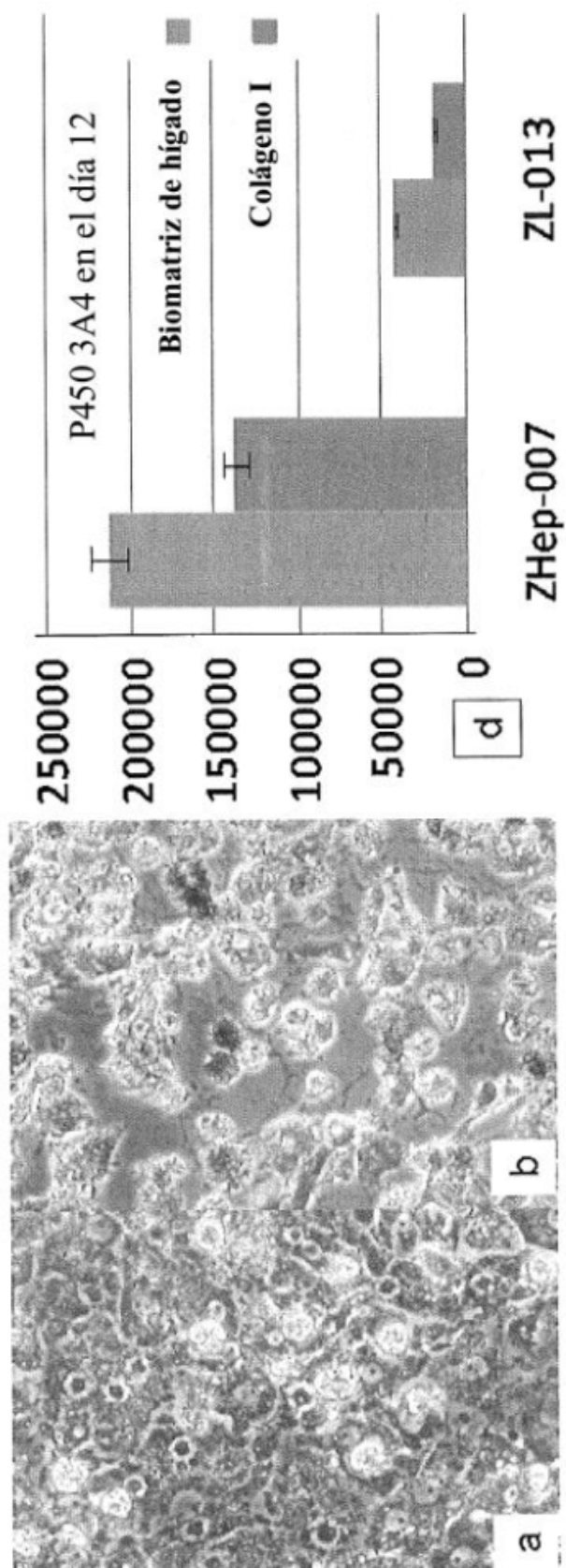


FIGURA 7

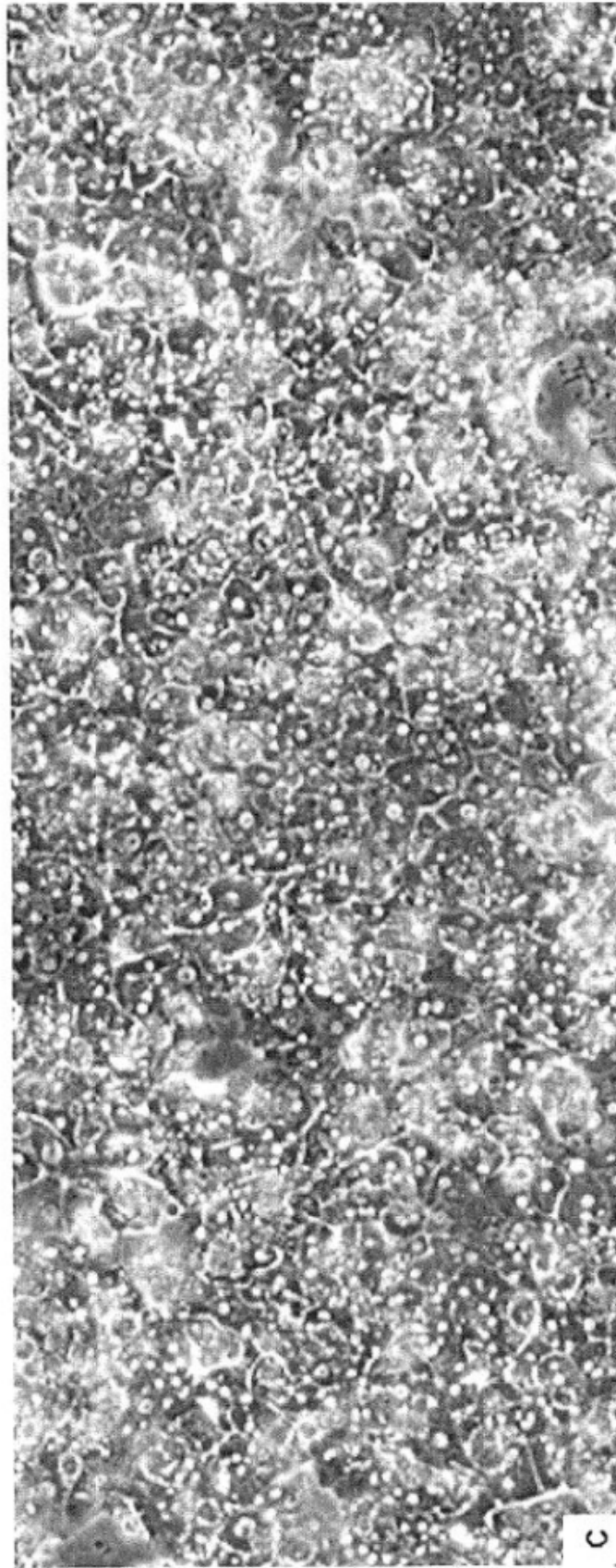


FIGURA 7 (continuación)

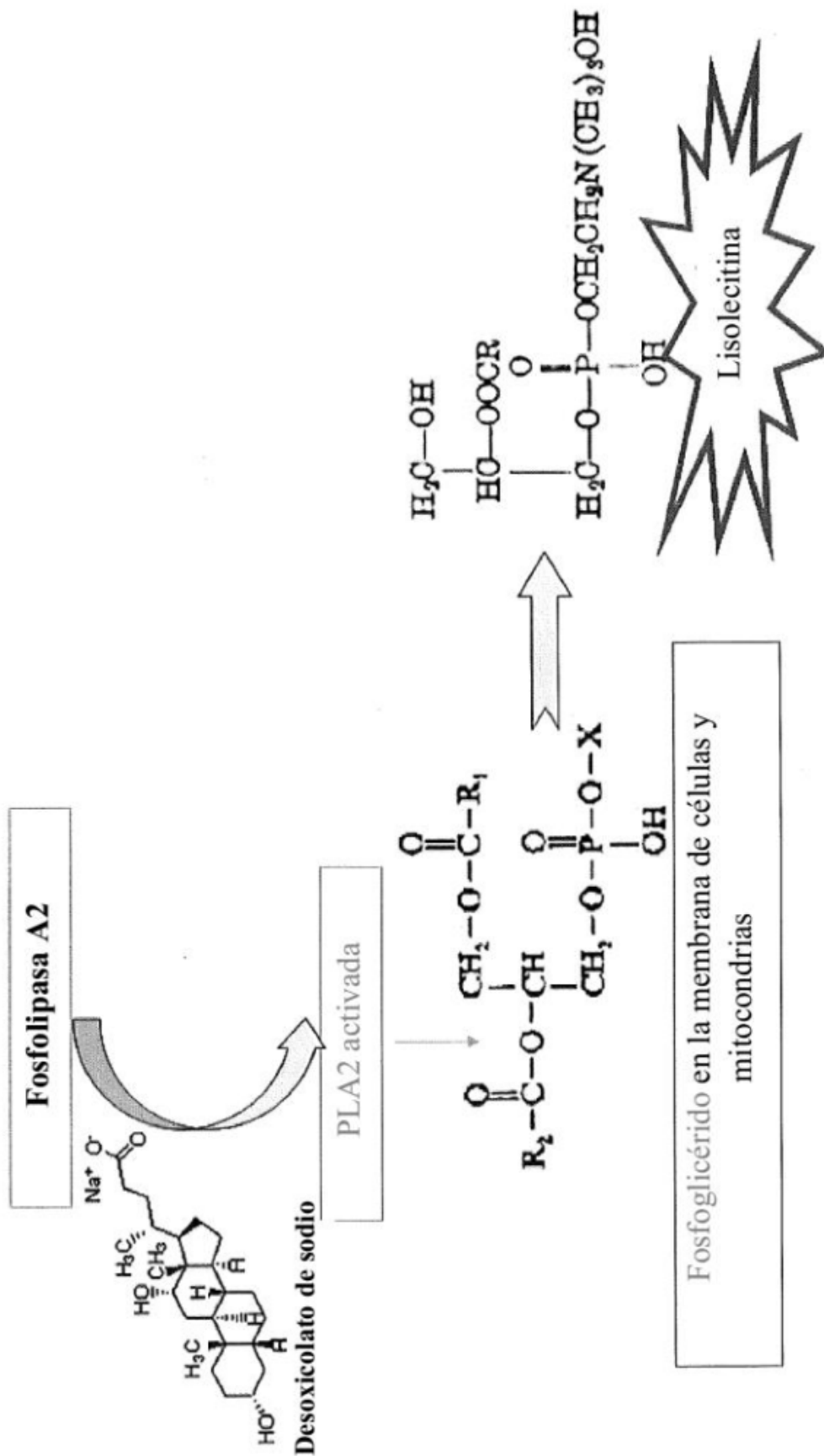


FIGURA 8

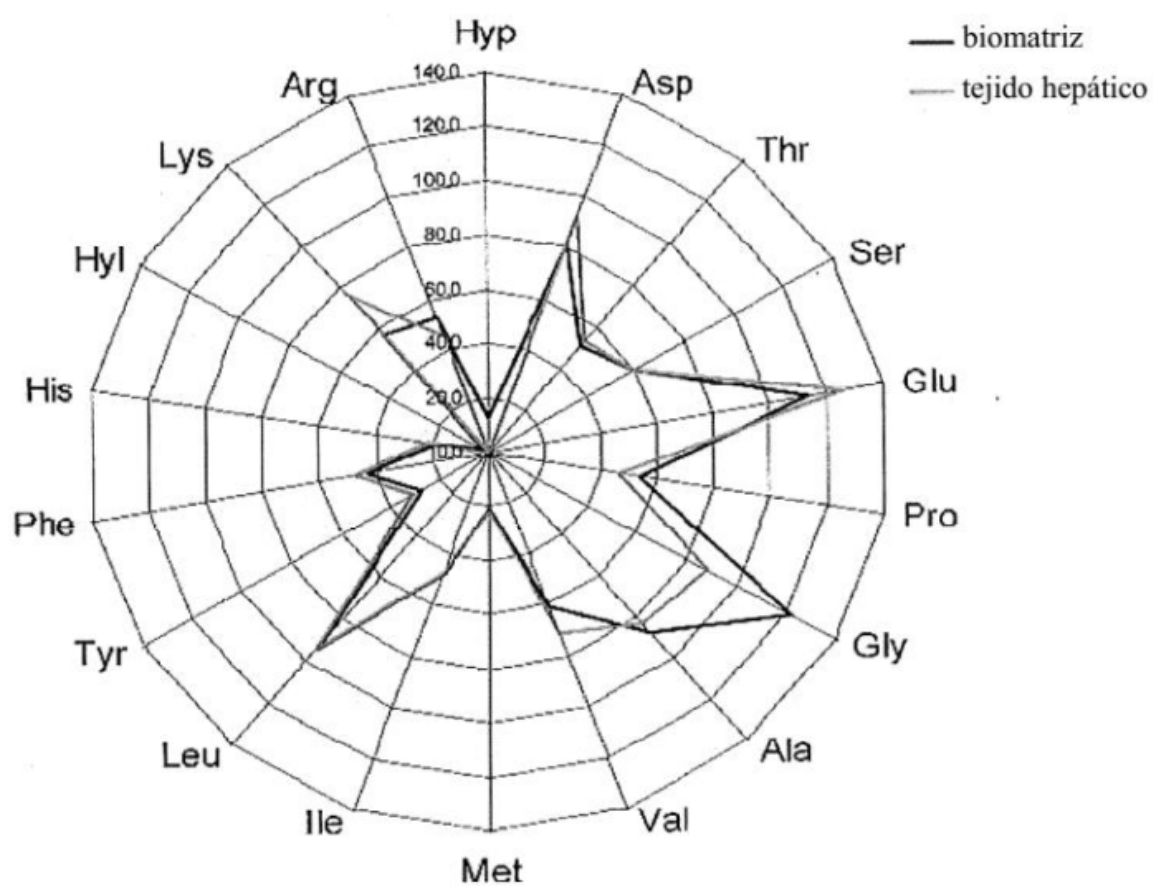
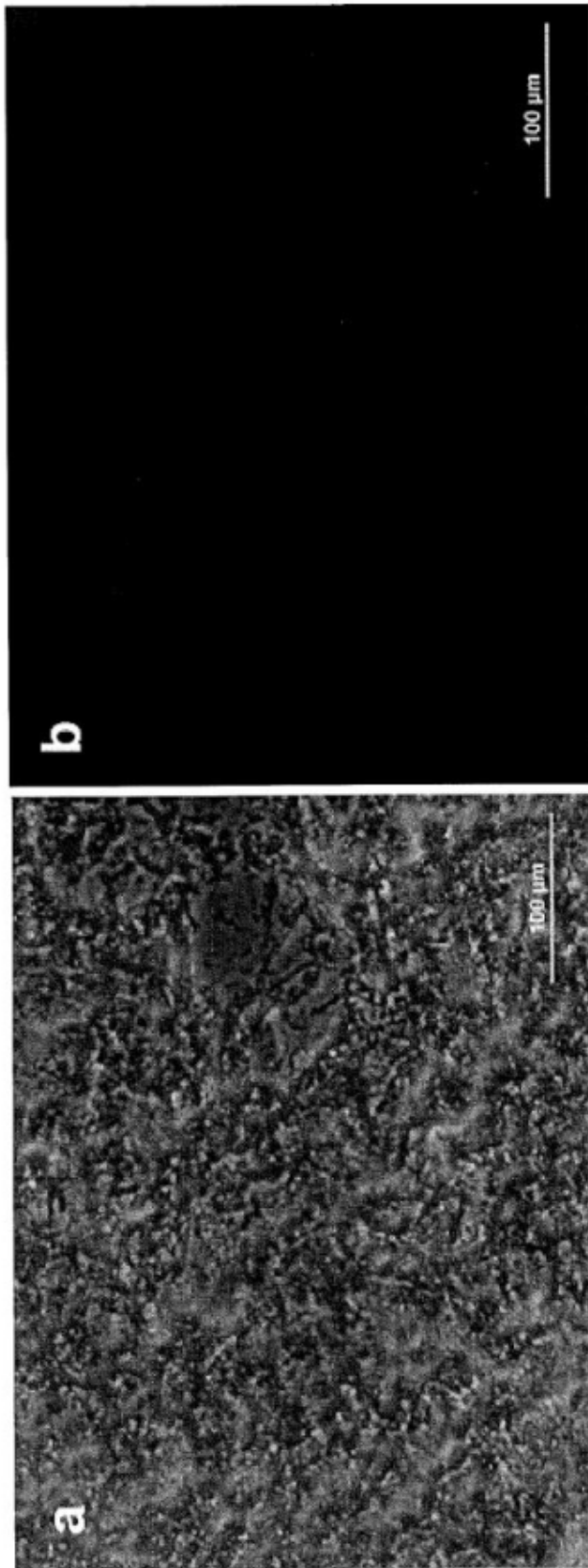


FIGURA 9



C

	Hígado fresco (n=6)	Biomatriz (n=5)	valor p	Relación
ADN (µg/g de peso húmedo)	585,82±4,78	17,85±0,96	<0,001 %	3,05%
ARN (mg/g de peso húmedo)	5,38±1,02	No detectado	N/A	N/A

FIGURA 10

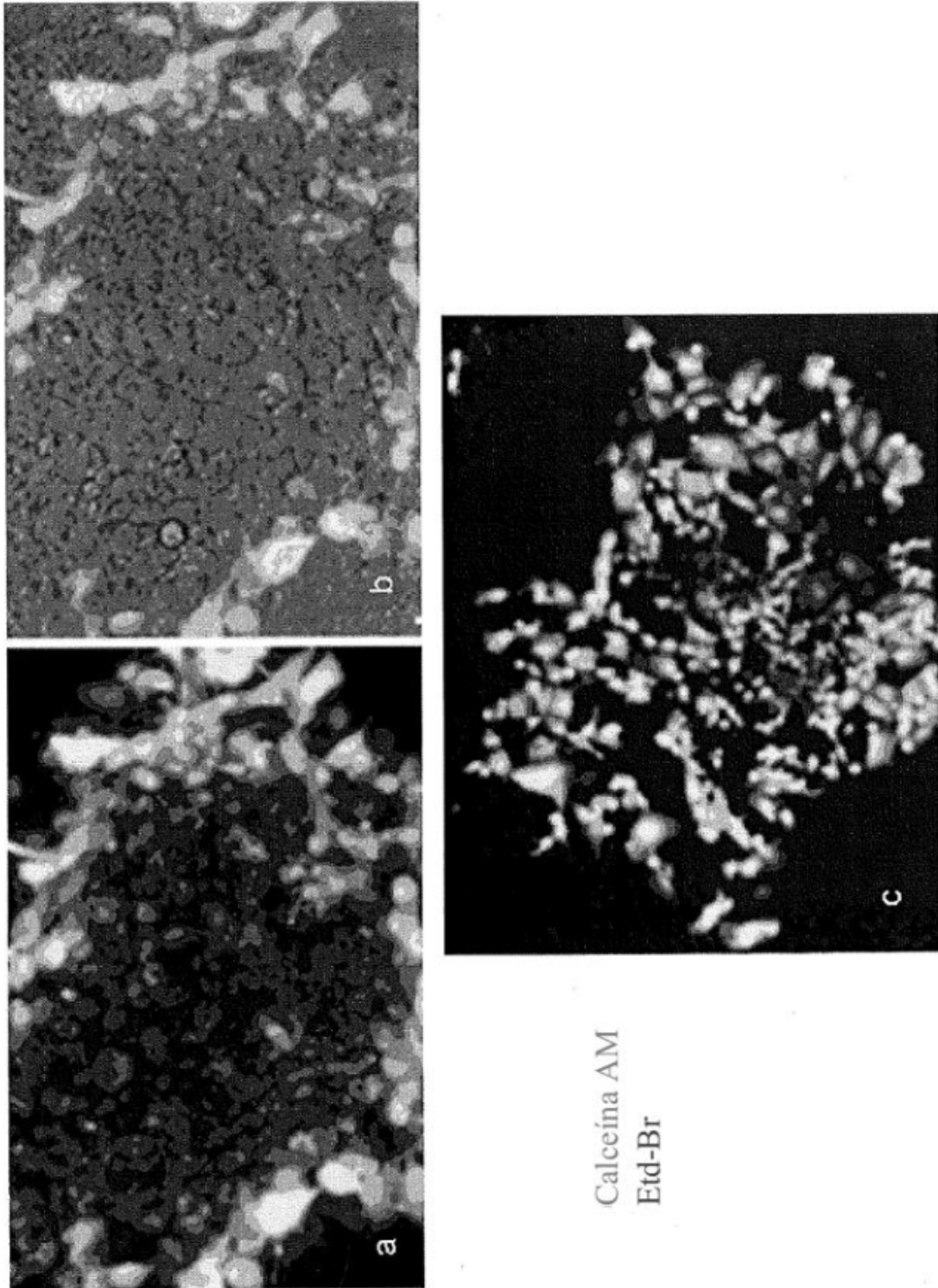


FIGURA 11

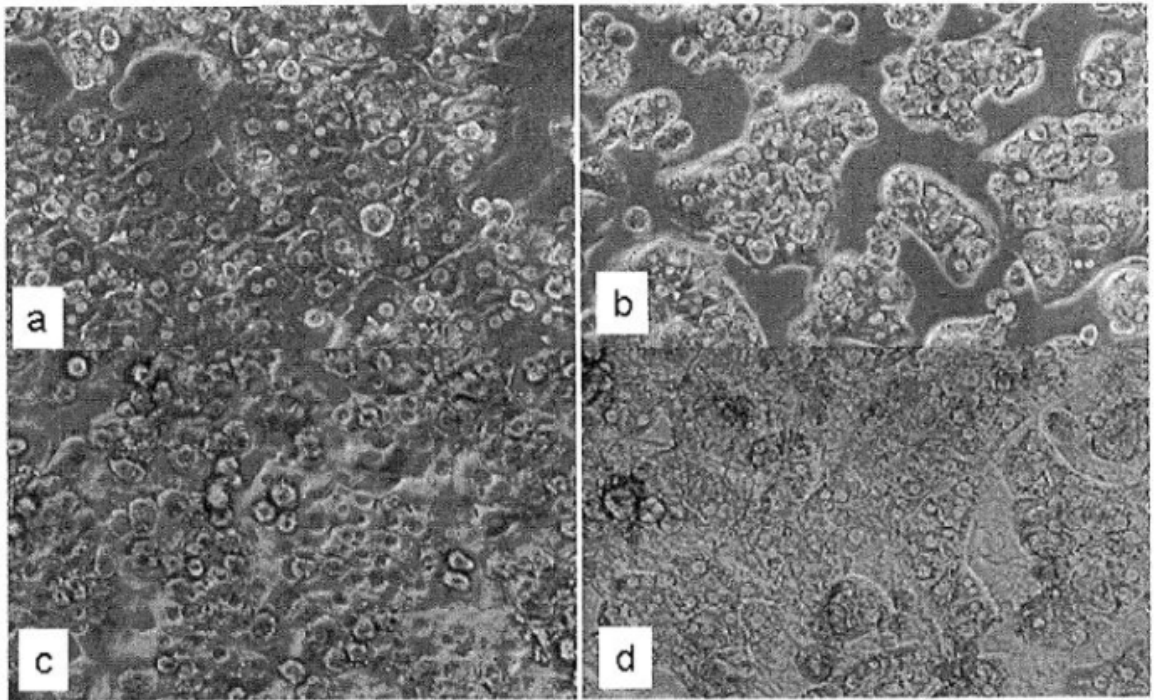


FIGURA 12

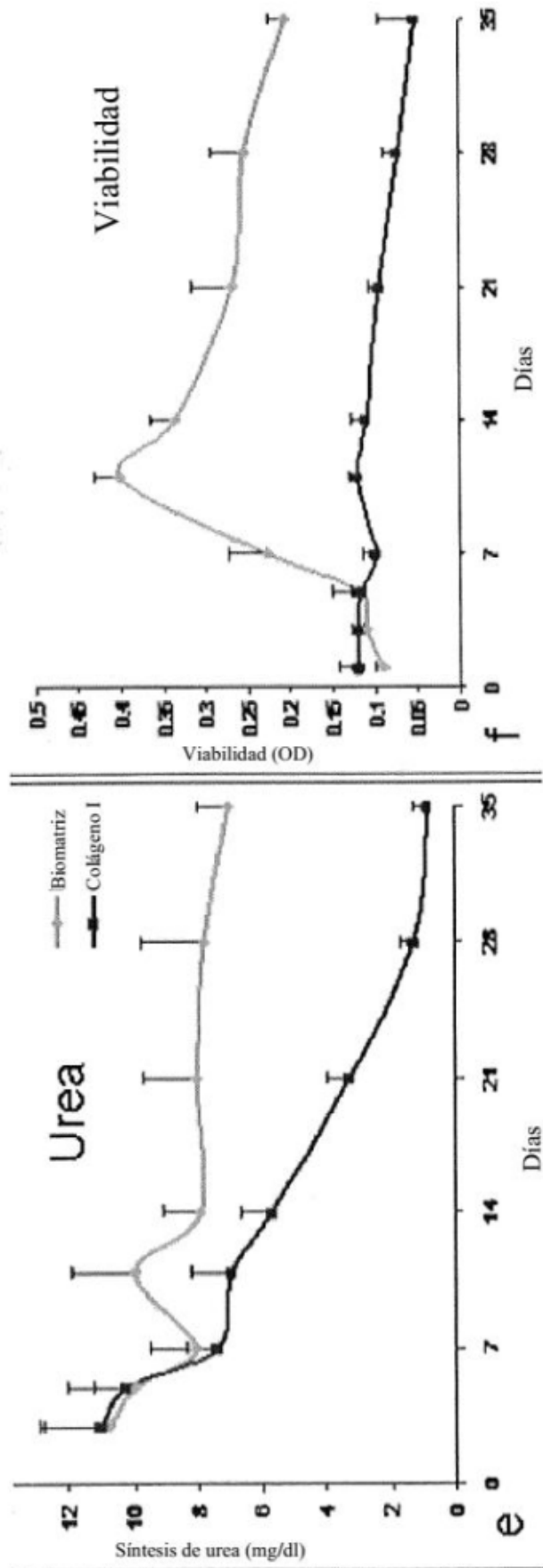


FIGURA 12 (continuación)

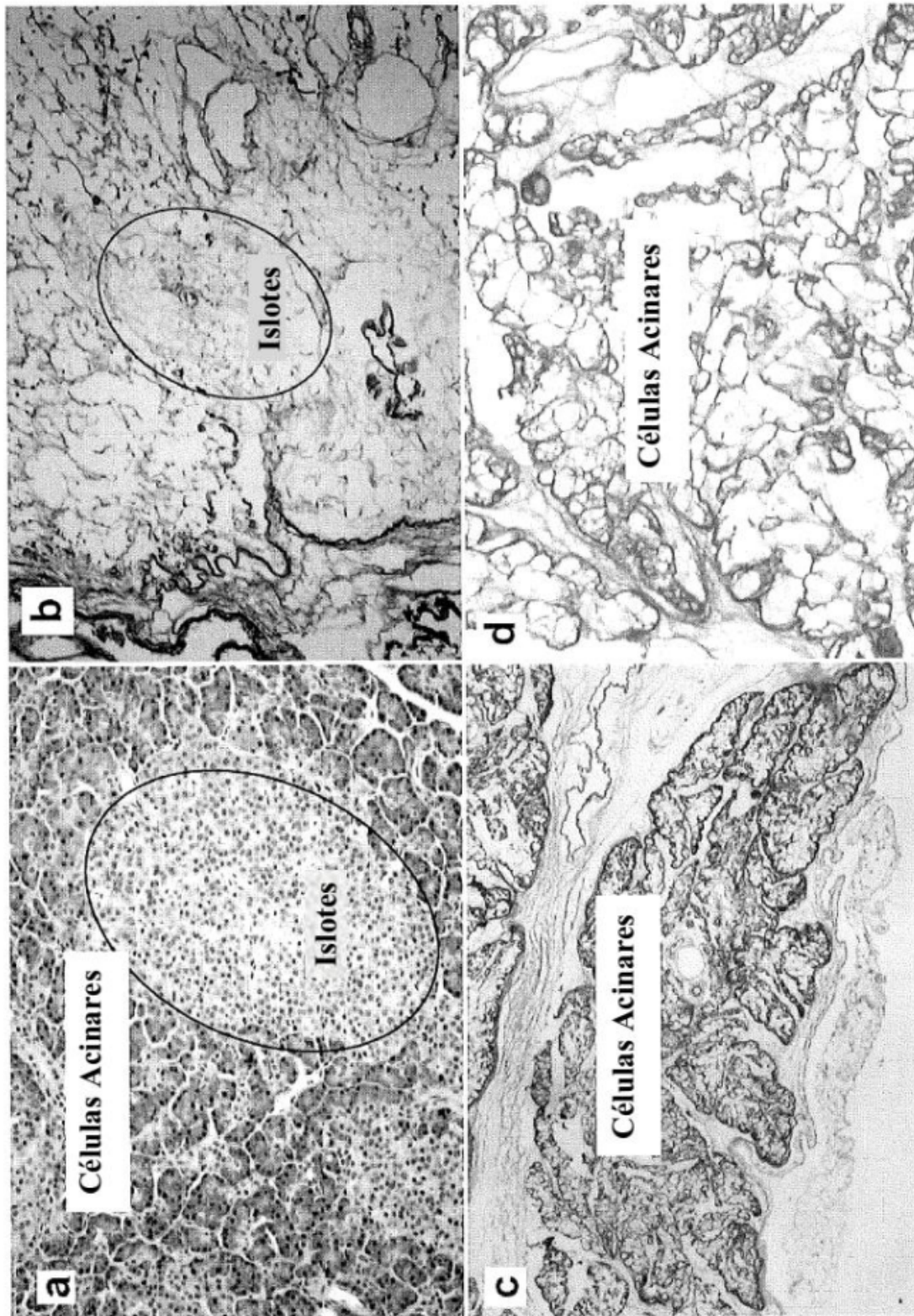


FIGURA 13

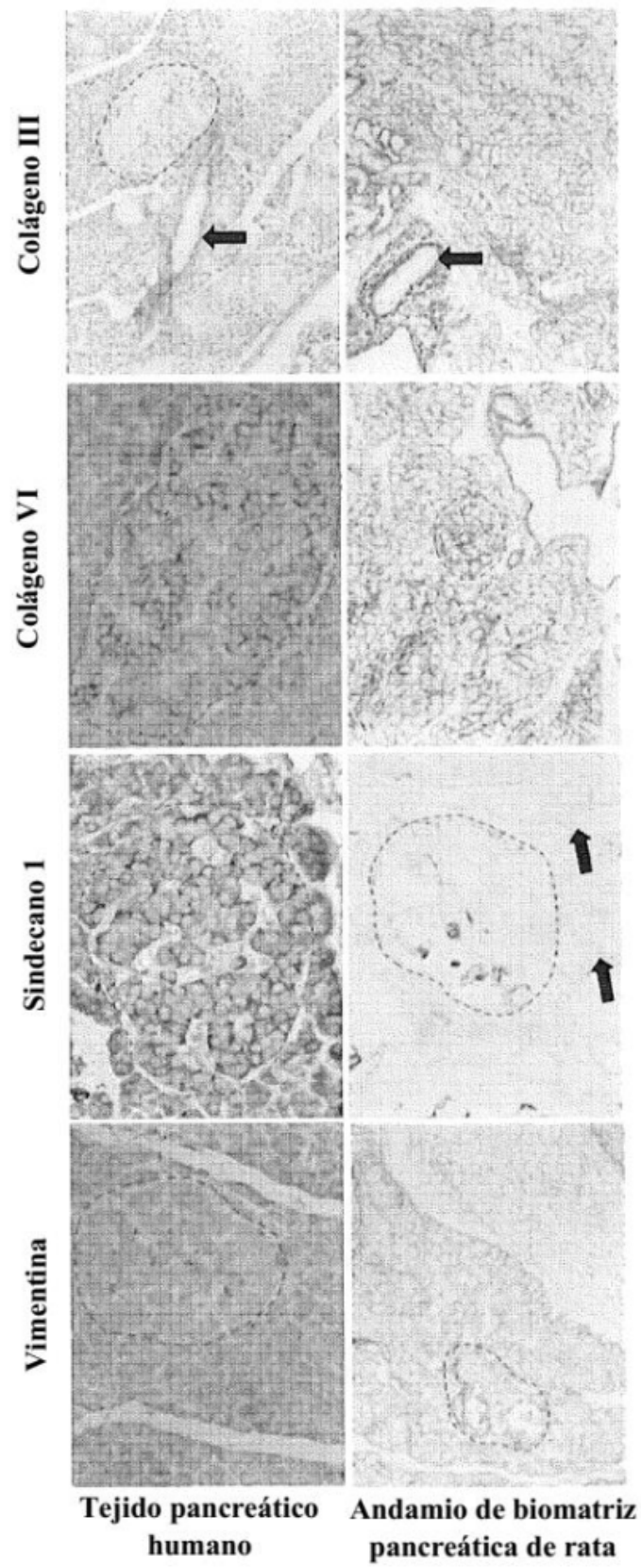


FIGURA 14



FIGURA 15

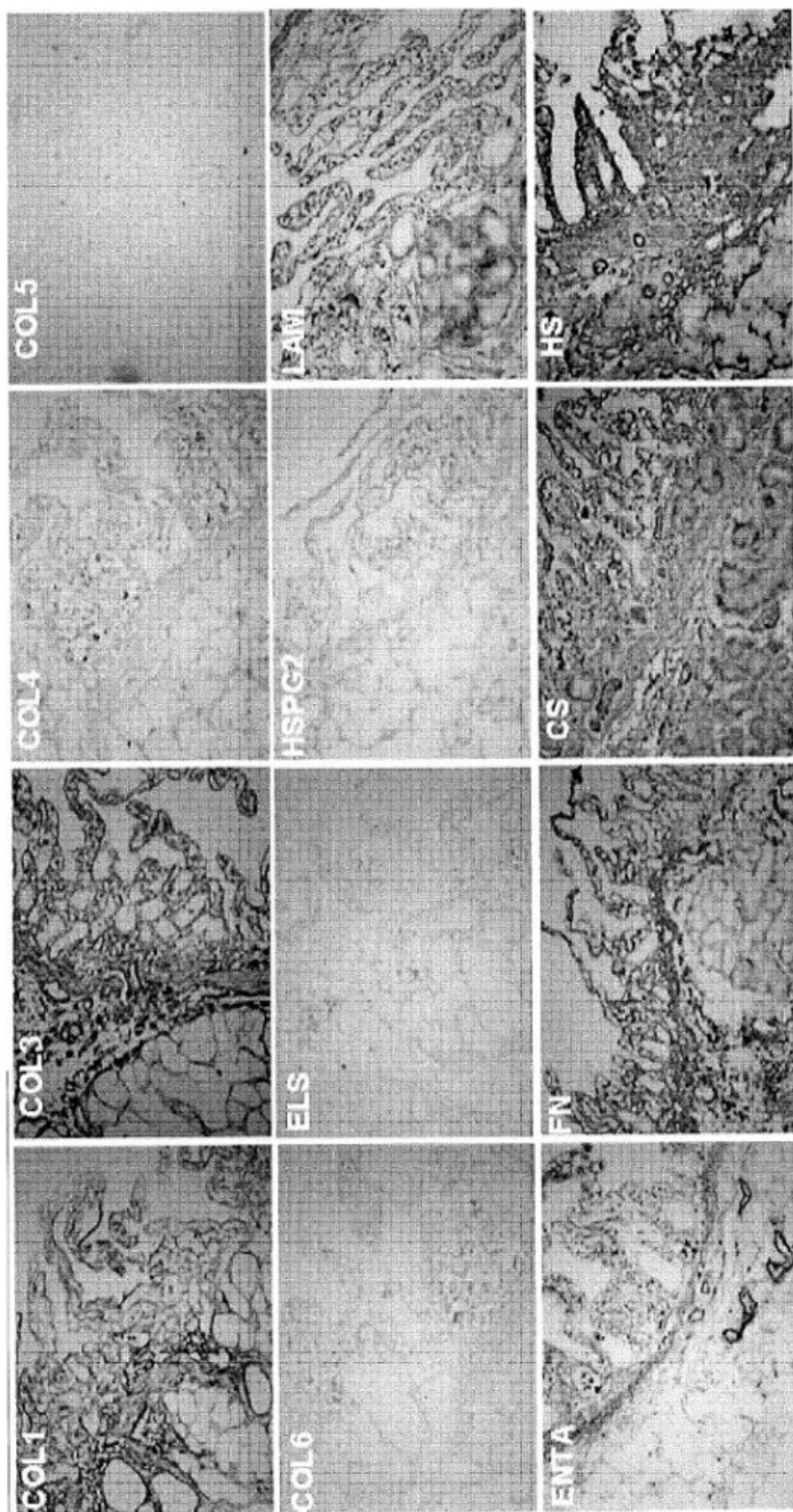


FIGURA 15 (continuación)

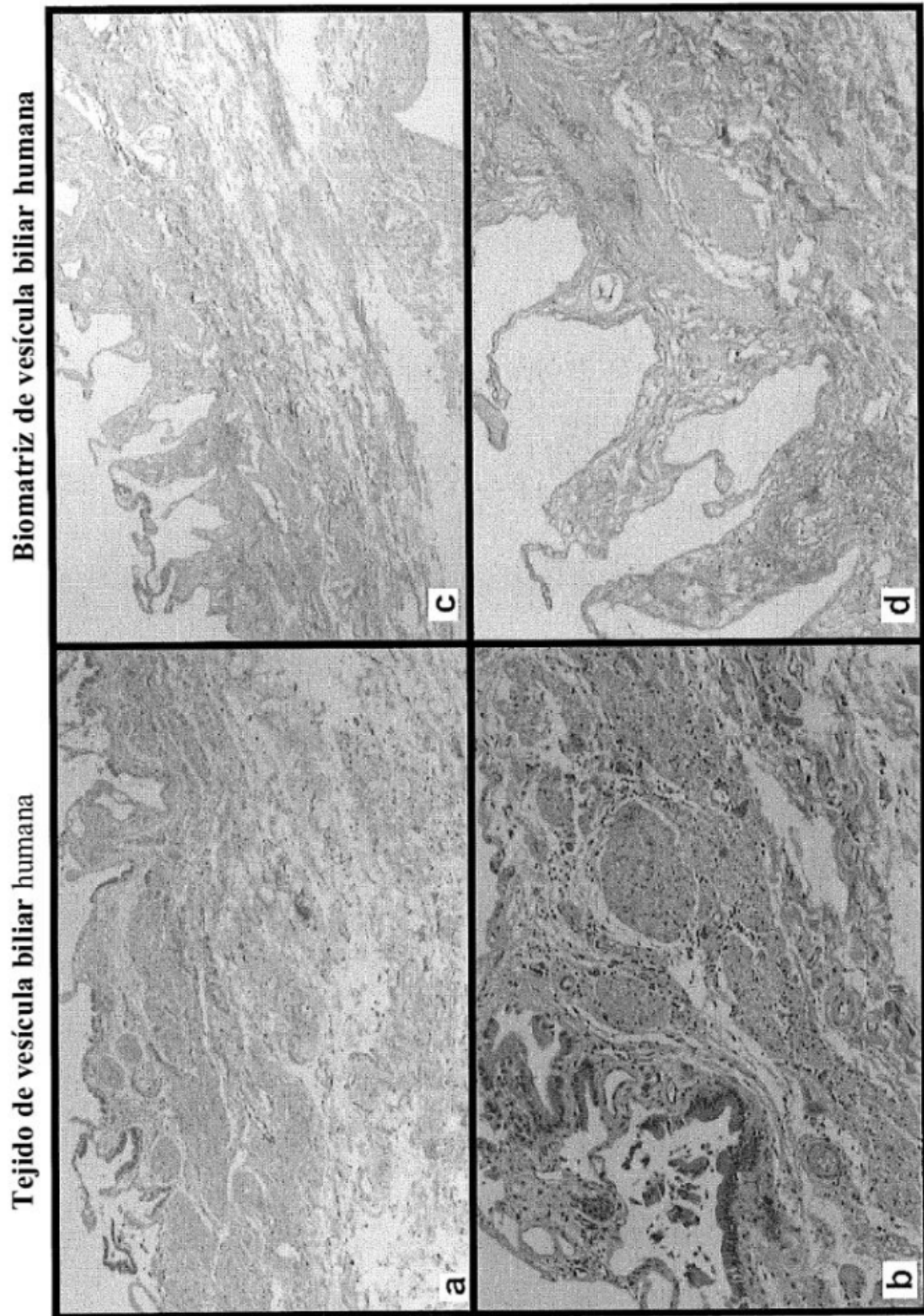


FIGURA 16

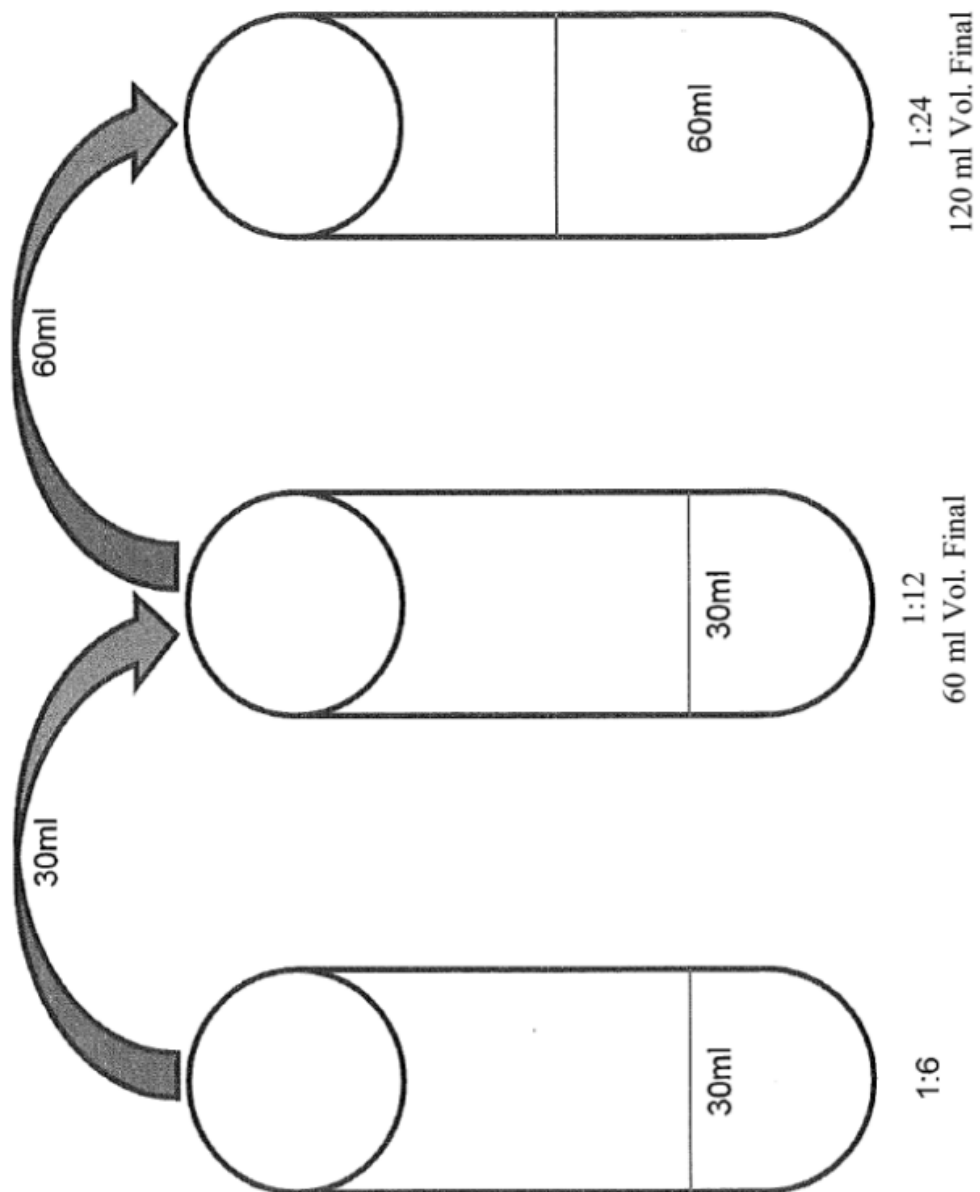


FIGURA 17