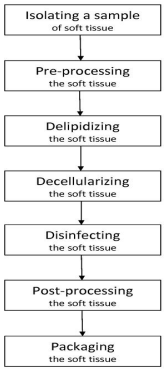
Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Radicación	16 49384 0000 0000	2016-02-26 10:30:26	
Trámite	11	PCT-PATENTE DE INVENCION CAPITULOS I Y II	
Evento	378	FASE NACIONAL INCLUIDO CAPITULO I	
Actuación	411	PRESENTACION	Folios: 16
Dependencia	2020	DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES	
Pago #1	18080	$ 64000	

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT



1	**Titulo de la Invención**(200 caractares o espacios máximos)
	MATRICES DERIVADAS DE TEJIDO SUAVE ACELULAR Y MÉTODOS PARA PREPARAR LAS MISMAS

2	**Datos del Solicitante**			
	Nombre:	MUSCULOSKELETAL TRANSPLANT FOUNDATION	**Dirección Electrónica:**	notificaciones@clarkemodet.com.co
	Dirección:	125 May Street, Suite 300, Edison Corporate Center.	**Domicilio/País de constitución:**	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA - NEW JERSEY - EDISON

Identificación:

- ☐ CEDULA DE CIUDADANIA
- ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA
- ☒ EMPRESA EXTRANJERA
- ☐ NIT
- ☐ PASAPORTE

Número:	1048107-		

3	**Solicitantes**		
	Apellidos - Nombres o Razón Social	**Tipo**	**Identificación**
1.	MUSCULOSKELETAL TRANSPLANT FOUNDATION	NN	1048107

4	**Datos del Inventor**			
	Nombre:	Yen-Chen HUANG	**Dirección Electrónica:**	notificaciones@clarkemodet.com.co
	Dirección:	9 Vista Court.	**Domicilio/País de constitución:**	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA - NEW JERSEY - EAST BRUNSWICK
	Identificación: ☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT ☐ PASAPORTE ☒ No Aplica			
	Número: -			

5	**Inventor(es)**	
	Apellidos - Nombres	**Domicilio**
1.	HUANG Yen-Chen	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
2.	IVERY Asia	CANADA
3.	CHOI Bryan	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
4.	SCHILLING Benjamin	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
5.	NGO Manh-Dan	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

6	**Datos Inventor(es)**

	País de Residencia	Departamento/Estado	Ciudad	Dirección
1.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	NEW JERSEY	EAST BRUNSWICK	9 Vista Court.
2.	CANADA	NOVA SCOTIA	BOYLSTON	1088 Eastside Harbour Road.
3.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	CALIFORNIA	SAN MARCOS	1980 Northstar Way #368, San Marcos.
4.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	NEW JERSEY	JERSEY CITY	162 Steuben Street Apt. 3
5.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	NEW JERSEY	MATAWAN	19 Angelica Ct.

7	Datos del Representante Legal / Apoderado		
Nombre:	CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO	**Dirección Electrónica:**	notificaciones@clarkemodet.com.co
Dirección:	CARRERA 11 NO. 86-53, PISO 6	**Domicilio/País de constitución:**	COLOMBIA - BOGOTA D.C. - BOGOTA D.C.

Identificación:

☒ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA

☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT

☐ PASAPORTE

Número: 66783790-

Presentación de Poder	
Año de Radicación	
Número de Radicación	

8	Datos Solicitud: PCT / WO		
Número Solicitud:	PCT/US2014/048797	**Fecha Solicitud:**	30/07/2014
Número Publicacion:	WO 2015/017500	**Fecha Publicacion:**	05/02/2015

9	Declaraciones de prioridad	☒ SI ☐ NO

	(33) País de origen	Codigo del país	(31) No. Solicitud	(32) Fecha _
1.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	US	61/860,043	30/07/2013

10	Reivindicaciones			
Número reivindicaciones:	56	**Pago Reivindicaciones:**	No	

11 Reducción de tasas.

Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.

☐ SI ☒ NO

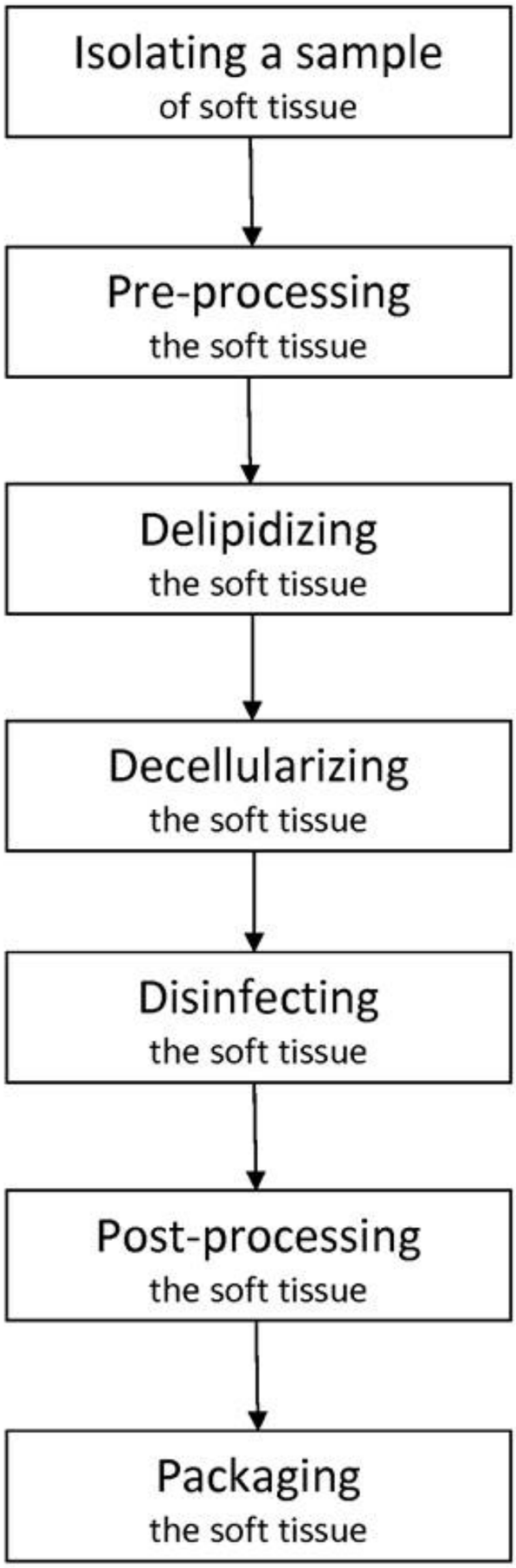
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolucón vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

☐ Micro, pequeñas y medianas empresas
☐ Universidades públicas o privadas
☐ Entidades sin ánimo de lucro

Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos

12 Documentos Anexos

☒ Reivindicaciones
☒ Descripción
☐ Dibujos y/o Figuras
☒ Resumen
☐ Certificado Depósito Material Biológico
☐ Uso de Conocimiento tradicional
☐ Listado de secuencias
☒ Artes finales 12 x 12 cm
☒ Poderes, si fuere el caso
☐ Copia de la primera solicitud si se reivindica prioridad
☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
☒ Otros Anexos


Isolating a sample
of soft tissue
Pre-processing
the soft tissue
Delipidizing
the soft tissue
Decellularizing
the soft tissue
Disinfecting
the soft tissue
Post-processing
the soft tissue
Packaging
the soft tissue

MATRICES DERIVADAS DE TEJIDO SUAVE ACELULAR Y MÉTODOS PARA PREPARAR LAS MISMAS

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere en general a matrices hechas de tejidos suaves descelularizados, que incluyen tejido adiposo, dermis, facia, músculo, pericardio y otros tejidos conectivos o membranosos, y en particular, a estas matrices que son adecuadas para el implante en un cuerpo vivo en procedimientos de cirugía plástica, que incluyen procedimientos de cirugía reconstructiva o cosmética.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las técnicas para restaurar la estructura y función para tejido dañado se utilizan rutinariamente en el campo de la cirugía plástica, que incluye la cirugía reconstructiva y cosmética. El trasplante de tejido es una manera de restaurar la estructura y función al reemplazar o reconstruir el tejido dañado. La transferencia de material biológico de un individuo a otro puede plantear riesgos significativos. Un riesgo de este tipo es el rechazo de tejido, el cual puede ocurrir incluso en casos donde existe una buena coincidencia de histocompatibilidad. El riesgo de rechazo de tejido se puede reducir al procesar tejidos de

modo que se vuelvan esencialmente libres de componentes celulares (por ejemplo, membranas celulares, ácidos nucleicos, lípidos y componentes citoplásmicos) que causan respuestas inmunogénicas. Estos tejidos son referidos algunas veces como matrices descelularizadas, libres de células o acelulares. También es deseable retener los factores de crecimiento que se requieren para promover el crecimiento celular hacia adentro en la matriz acelular, reemplazando eventualmente la matriz acelular por tejido nativo del paciente.

En particular, los materiales de relleno de tejido suave inyectables han expandido las opciones no quirúrgicas que están disponibles para el reemplazo en volumen, el llenado de defectos faciales y el rejuvenecimiento en el envejecimiento de la cara. Los rellenadores de tejido suave inyectables se utilizan ampliamente para aplicaciones estéticas tanto superficiales como profundas, que incluyen el aumento de labios o el rejuvenecimiento del envejecimiento de labios para restaurar la forma y el contorno, el llenado de líneas finas para reducir la apariencia de arrugas alrededor de los ojos o la boca, el mejoramiento de surcos nasolabiales, la corrección de deformidades de los párpados, el llenado del volumen para los cachetes y el perfil de la mandíbula y para el llenado de arrugas o cicatrices profundas.

Existen muchos materiales de relleno de tejido suave que están disponibles comercialmente para estas aplicaciones, y en general, se encuentran dentro de las siguientes categorías: materiales de implante autólogos, colágenos, ácido hialurónico (HA) y polímeros biosintéticos. La durabilidad de estos materiales varía de varias semanas a años, o se considera permanente.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

Las modalidades de la presente invención se refieren en general a matrices derivadas de tejido suave descelularizado (también referidas como "matrices acelulares") que son adecuadas para el uso en procedimientos de cirugía plástica, que incluyen procedimientos reconstructivos y cosméticos. Las matrices se pueden derivar de una variedad de tipos de tejidos de mamíferos, que incluyen tejidos de humanos. Estos tipos de tejidos incluyen, pero no están limitados a, tejido adiposo, dermis, facia, musculo, pericardio y otros tejidos conectivos o membranosos. En modalidades de la presente invención, las matrices están en la forma de partículas liofilizadas (es decir, secadas por congelamiento). De acuerdo con algunas modalidades de la presente invención, las partículas se rehidratan en un portador para inyección dentro de un paciente. De acuerdo con algunas modalidades

de la presente invención, las matrices son autólogas para el paciente. En otras modalidades, los tejidos son aloinjertos. En todavía otras modalidades, las matrices son xenoinjertos. De acuerdo con algunas modalidades de la presente invención, las matrices están en la forma de láminas o tiras. En otras modalidades de la presente invención, las matrices están en una forma particulada. En todavía otras modalidades de la presente invención, las matrices están en la forma de una pasta, gel, suspensión o suspensión espesa inyectable. De acuerdo con algunas modalidades de la presente invención, las matrices están en una forma liofilizada (es decir, secada por congelamiento). En otras modalidades de la presente invención, las matrices están en una forma rehidratada. De acuerdo con algunas modalidades, las matrices han sido sembradas de nuevo con células. De acuerdo con algunas modalidades de la presente invención, los factores para promover y dirigir el crecimiento hacia adentro y diferenciación de tejidos (por ejemplo, factores de crecimiento, tales como VEGF o bFGF) se han agregado a las matrices.

Otras modalidades de la presente invención se refieren a un proceso para preparar matrices acelulares a partir de tejidos suaves. Algunas modalidades del proceso incluyen los pasos que consisten en: (1) aislar un tejido suave deseado que se obtiene de un donador; (2)

descelularizar el tejido por medio de un proceso el cual incluye remojar el tejido aislado en una solución hipertónica, remojar el tejido aislado en un surfactante y remojar o enjuagar el tejido procesado en agua estéril; (3) desinfectar el tejido descelularizado; y (4) procesar posteriormente el tejido en una forma deseada. De acuerdo con algunas modalidades del proceso, el proceso incluye un paso que consiste en retirar lípidos del tejido aislado (es decir, deslipidizar/deslipidar el tejido), lo cual se puede realizar antes de descelularizar el tejido aislado. De acuerdo con algunas modalidades del proceso, el paso de deslipidización se realiza al agitar el tejido aislado en un alcohol.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La presente invención se explicará adicionalmente con referencia a los dibujos anexos, en donde:

la FIGURA 1 es un diagrama de flujo esquemático que ilustra un proceso para preparar una matriz derivada de tejido suave acelular de acuerdo con una modalidad de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Las modalidades detalladas de la presente invención se dan a conocer en este documento. Se debe

entender que las modalidades dadas a conocer son solamente ilustrativas de la invención que se puede incorporar en varias formas. Además, se pretende que cada uno de los ejemplos proporcionados en relación con las diversas modalidades de la invención sea ilustrativo y no restrictivo.

La presente invención se refiere en general a matrices hechas a partir de tejidos suaves descelularizados que incluyen, pero no están limitados a, tejido adiposo, dermis, facia, musculo, pericardio y otros tejidos conectivos o membranosos. Los tejidos suaves descelularizados, y los métodos para hacerlos, también se dan a conocer en la Patente de los Estados Unidos No. 7,723,108, de propiedad compartida, expedida el 25 de Mayo de 2010, la cual se incorpora en este documento a manera de referencia. Las matrices acelulares de la presente invención en una forma particulada o de suspensión espesa se pueden utilizar como agentes de carga en procedimientos de cirugía reconstructiva o cosmética (por ejemplo, para rellenar huecos en tejido o para alisar arrugas) y como andamios para la reparación y regeneración de tejidos. En forma de tiras o láminas, las matrices acelulares de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar para proporcionar soporte estructural a otros tejidos, y también para proporcionar andamios para la reparación y

regeneración de tejidos. Los ejemplos de procedimientos en los cuales se pueden utilizar matrices acelulares incluyen, pero no están limitados a, reemplazo del volumen, relleno de defectos faciales y rejuvenecimiento en el envejecimiento de la cara. Las matrices acelulares inyectables también se pueden utilizar para aplicaciones estéticas tanto superficiales como profundas, que incluyen el aumento de labios o el rejuvenecimiento del envejecimiento de labios para restaurar la forma y el contorno, llenado de líneas finas para reducir la apariencia de arrugas alrededor de los ojos o la boca, mejoramiento de surcos nasolabiales, corrección de deformidades de los párpados, llenado del volumen para los cachetes y el perfil de la quijada y para el llenado de arrugas o cicatrices profundas.

El término “tejidos suaves” se refiere en general a tejidos no calcificados del cuerpo de mamíferos. Para los propósitos de la presente descripción, estos tejidos incluyen un tejido adiposo, tejido placentario, tejido arterial, tejido de cartílago, tejido conectivo, tejido coriónico, tejido colónico, tejido dental no calcificado, tejido dérmico, tejido duodenal, tejido endotelial, tejido epitelial, tejido facial, tejido gastrointestinal, tejido gingival, tejido de placa de crecimiento, tejido de discos intervertebrales, tejido de la mucosa intestinal, tejido

seroso intestinal, tejido de ligamentos, tejido de hígado, tejido pulmonar, tejido mamario, tejido membranoso, tejido de meniscos, tejido muscular, tejido nervioso, tejido ovárico, tejido de órganos parenquimatosos, tejido pericárdico, tejido perióstico, tejido peritoneo, tejido placentario, tejido cutáneo, tejido de bazo, tejido estomacal, tejido sinovial, tejido de tendones, tejido de testículos, tejido de cordón umbilical, tejido urológico, tejido vascular, tejido de venas y otros tejidos no calcificados.

TIPOS DE TEJIDOS

Los tejidos de los cuales se pueden formar las matrices acelulares de la presente invención, así como también tejidos los cuales se pueden aumentar o reparar utilizando estas matrices acelulares se describen más completamente a continuación.

1. Compartimentos de Tejidos

En los organismos multicelulares, las células que se especializan para realizar funciones comunes se organizan usualmente en ensamblajes cooperativos incorporados en una red compleja de macromoléculas extracelulares secretadas (es decir, la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés)), para formar

compartimentos de tejidos especializados. Las células individuales en estos compartimentos de tejidos están en contacto con macromoléculas de ECM. La ECM ayuda a mantener juntos las células y los compartimientos y proporciona un retículo o andamio organizado dentro del cual las células pueden emigrar e interactuar entre sí. En muchos casos, las células en un compartimiento se pueden mantener en su lugar por medio de adhesiones directas de célula-célula. En los vertebrados, estos compartimientos pueden ser de cuatro tipos principales, un compartimiento de tejido conectivo (CT, por sus siglas en inglés), un compartimiento de tejido epitelial (ET, por sus siglas en inglés), un compartimiento de tejido muscular (MT, por sus siglas en inglés) y un compartimento de tejido nervioso (NT, por sus siglas en inglés), los cuales se derivan de tres capas germinales embriónicas: ectodermo, mesodermo y endodermo. El NT y porciones de los compartimentos de ET se diferencian del ectodermo; el CT, MT y ciertas porciones de los compartimentos de ET se derivan del mesodermo; y porciones adicionales del compartimiento de ET se derivan del endodermo.

1.1. Matriz Extracelular

La ECM es una red intrincada de macromoléculas extracelulares secretadas que llena en gran medida el

espacio extracelular en los compartimentos de tejido y comprende grandes complejos poliméricos de glicosaminoglicanos (GAGs) y proteoglicanos. Los GAGs son cadenas de polisacáridos no ramificadas con carga negativa que comprenden unidades de disacáridos de repetición. Cada unidad de disacárido de repetición de una cadena de GAG contiene un azúcar de amino (por ejemplo, N-acetil-glucosamina), la cual es sulfatada en la mayoría de los casos, y un ácido urónico (por ejemplo, ácido glucurónico o idurónico). Los cuatro tipos principales de moléculas de GAG se distinguen con base en residuos de azúcar, tipo de enlace, número y ubicación de grupos sulfato: (1) hialuronano; (2) sulfato de condroitano y sulfato de dermatano; (3) heparán sulfato y heparina; y (4) sulfato de queratina.

Las cadenas de GAG no son flexibles y tienden a adoptar conformaciones extendidas que ocupan un enorme volumen en relación con su masa, formando geles incluso a bajas concentraciones. Su densidad alta de cargas negativas atrae cationes, tales como Na^+, que son efectivos en la absorción osmótica de grandes cantidades de agua en la matriz. Esto crea una alta rigidez que hace posible que la ECM resista fuerzas compresivas.

El hialuronano (también denominado ácido hialurónico o hialuronato) (HA), el cual comprende una

secuencia de repetición regular de hasta 25,000 unidades de disacáridos no sulfatados, sirve para muchas funciones, muchas de las cuales dependen de la unión de proteína que se unen a HA y proteoglicanos, los cuales son ya sea por sí mismos constituyentes de la ECM o son constituyentes integrales de superficies celulares. Por ejemplo, el HA resiste fuerzas compresivas en articulaciones como un constituyente principal de fluido de articulación que sirve como lubricante; sirve como un material de relleno de espacios durante el desarrollo embriónico; crea un espacio libre de células en el compartimiento epitelial para permitir la migración de células durante la formación del corazón, córneas y otros órganos; y desempeña un papel en la reparación de heridas. El HA en exceso es degradado usualmente por la hialuronidasa.

Todos los GAGs, excepto por el HA, se vinculan covalentemente con proteínas en la forma de proteoglicanos. Durante su síntesis, la cadena de polipéptidos de los proteoglicanos se sintetiza en ribosomas unidos a la membrana y se ensarta en el lumen del retículo endoplásmico, del cual se clasifican en el aparato de Golgi, y se ensamblan con cadenas de polisacáridos. Mientras que aún están en el aparato de Golgi, los proteoglicanos se someten a una serie de reacciones de sulfatación y epimerización secuenciales y coordinadas para

producir proteoglicanos sulfatados. Los proteoglicanos sulfatados y no sulfatados entonces viajan a través de la red de Golgi y son secretados finalmente en la ECM por medio de exocitosis con la ayuda de vesículas secretorias.

Los proteoglicanos son moléculas heterogéneas, con proteínas de núcleo que varían en el peso molecular de 10 kD a aproximadamente 600 kD y con cadenas de GAG unidas que varían en el número y el tipo, modificadas adicionalmente por un patrón variable complejo de grupos sulfato. Por lo menos una de las cadenas laterales de azúcar de proteoglicano es un GAG; la proteína de núcleo es usualmente una glicoproteína, pero puede comprender hasta 95% en peso de carbohidratos, principalmente como cadenas de GAG no ramificadas largas hasta por lo menos 80 residuos de azúcar de largo.

Los proteoglicanos junto con sus cadenas de GAG unidas regulan las actividades de macromoléculas secretadas. Estos pueden servir como tamices moleculares selectivos que regulan un tráfico basado en el tamaño de moléculas y células, y desempeñan un papel en la señalización de célula-célula. Los proteoglicanos modulan las actividades de factores secretados, tales como factores de crecimiento y citocinas, al unirse a los mismos. Por ejemplo, la unión del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, por sus siglas en inglés) a cadenas de heparán

sulfato de proteoglicanos se requiere para la activación de FGF de sus receptores de la superficie celular. Por otra parte, por ejemplo, la unión de un factor regulador de crecimiento ubicuo, tal como el factor de crecimiento transformante β (TGF-β) a proteínas de núcleo de varios proteoglicanos de ECM, tal como decorina, da por resultado la inhibición de la actividad de TGF-β. Los proteoglicanos también se unen a y regulan las actividades de otros tipos de proteínas secretadas, tales como proteasas e inhibidores de proteasa. Los proteoglicanos de la superficie celular también pueden actuar como co-receptores: por ejemplo, el sindecano se une al FGF y lo presenta al receptor de FGF. Similarmente, el betaglicano se une al TGF-β y lo presenta a receptores de TGF-β.

Los colágenos y la elastina son las proteínas fibrosas principales de la ECM. Los colágenos comprenden una familia de proteínas fibrosas sumamente características y son un componente principal de la piel y los huesos. Las fibras de colágeno consisten de unidades globulares de la subunidad de colágeno tropocolágeno. Cada molécula de subunidad de tropocolágeno comprende tres cadenas de polipéptidos, llamadas cadenas α, cada una que exhibe una conformación hélica hacia la izquierda que son envueltas una alrededor de la otra en una estructura de superhélice hacia la derecha, también llamada una hélice triple o

superhélice. Una cualidad característica del colágeno es una unidad tripeptídica de repetición que comprende Glicina-Prolina-X o Glicina-X-Hidroxiprolina, donde X puede ser cualquier aminoácido. La presencia de glicina en cada tercera posición en una unidad de colágeno es crucial para el mantenimiento de la estructura de superhélice, puesto que cada residuo de glicina de repetición se asienta sobre el eje interior de la hélice, lo cual obstaculiza estéricamente las cadenas laterales más voluminosas. Las prolinas y las hidroxiprolinas ayudan a estabilizar la hélice triple. El colágeno es secretado como moléculas de procolágeno, las cuales se someten al procesamiento proteolítico y el ensamblaje subsecuente para formar fibrillas de colágeno. Los colágenos son sumamente glicosilados durante el tráfico de proteínas a través de vías secretorias intracelulares.

Los colágenos se clasifican en varios tipos dependiendo de la naturaleza de sus cadenas α. La Tabla 1 lista tipos de colágeno, composición, clase y distribución. (Reproducida de Shoulders y Raines, Annu Rev. Biochem 2009, 78: 929-958 y Bailey's Textbook of Microscopic Anatomy, Kelly y colaboradores, Williams y Wilkins, 18ª edición, 1984).

Tabla 1. Tipo de Colágeno, Clase y Distribución

Tipo de Colágeno	Composición	Clase	Distribución
I	$\alpha_1[I]_2\alpha_2[I]$	Fibrilar	Dermis, tendón, ligamento, hueso, córnea
II	$\alpha_1[II]_3$	Fibrilar	Cartílago, disco intervertebral, cuerpo vítreo
III	$\alpha_1[III]_3$	Fibrilar	Piel fetal, sistema cardiovascular, lámina basal, intestino.
IV	$\alpha_1[IV]_2\alpha_2[IV]$; $\alpha_3[IV]\alpha_4[IV]\alpha_5[IV]$; $\alpha_5[IV]_2\alpha_6[IV]$	Red	Lámina basal, lámina externa
V	$\alpha_1[V]_3$; $\alpha_1[V]_2\alpha_2[V]$; $A_1[V]\alpha_2[V]\alpha_3[V]$	Fibrilar	Hueso, dermis, córnea, placenta
VI	$\alpha_1[VI]\alpha_2[VI]\alpha_3[VI]$; $\alpha_1[VI]\alpha_2[VI]\alpha_4[VI]$	Red	Hueso, cartílago, córnea, dermis
VII	$\alpha_1[VII]_2\alpha_2[VII]$	Fibrilla de anclaje	Dermis, vejiga
VIII	$\alpha_1[VIII]_3$; $\alpha_2[VIII]_3$; $\alpha_1[VIII]_2\alpha_2[VIII]$	Red	Dermis, cerebro, corazón, riñón
IX	$\alpha_1[IX]\alpha_2[IX]\alpha_3[IX]$	FACIT[a]	Cartílago, córnea, cuerpo vítreo
X	$\alpha_1[X]_3$	Red	Cartílago
XI	$\alpha_1[XI]\alpha_2[XI]\alpha_3[XI]$	Fibrilar	Cartílago, disco intervertebral
XII	$\alpha_1[XII]_3$	FACIT	Dermis, tendón
XIII	$\alpha_1[XIII]_3$	MACIT[3]	Células endoteliales, dermis, ojos, corazón

XIV	$\alpha_1[XIV]_3$	FACIT	Hueso, dermis, cartílago
XV		MULTIPLEXIN[a]	Vasos capilares, testículos, riñón, corazón, hueso
XVI		FACIT	Dermis, riñón
XVII	$\alpha_1[XVII]_3$	MACIT	Hemidesmosomas en el epitelio
XVIII		MULTIPLEXIN	Lámina basal, hígado
XIX		FACIT	Lámina Basal
XX		FACIT	Córnea
XXI		FACIT	Estómago, riñón
XXII		FACIT	Uniones de tejidos
XXIII		MACIT	Corazón, retina
XXIV		Fibrilar	Hueso, córnea
XXV		MACIT	Cerebro, corazón, testículos
XXVI		FACIT	Testículos, ovarios
XXVII			Dermis, nervio ciático
XXIX			Dermis

[a]Abreviaciones: FACIT, colágeno asociado con fibrillas con hélices triples interrumpidas; MACIT, colágeno asociado con la membrana con hélices triples interrumpidas; MULTIPLEXIN, múltiples dominios de hélices triples.

Una red de fibras elásticas en la ECM ofrece resiliencia y elasticidad de modo que los órganos son capaces de retraerse después de un estiramiento transitorio. Las fibras elásticas comprenden principalmente la proteína fibrosa elastina, una proteína sumamente

hidrófoba de aproximadamente 750 aminoácidos de longitud que es rica en prolina y glicina, no es glicosilada y es baja en hidroxiprolina e hidroxilisina. Las moléculas de elastina son secretadas en la ECM y se ensamblan en fibras elásticas cerca de la membrana plasmática. Con la secreción, las moléculas de elastina se vuelven sumamente reticuladas para formar una red extensiva de fibras y láminas.

La ECM también comprende muchas proteínas adhesivas diferentes de colágeno, usualmente con múltiples dominios que contienen sitios de unión de otras macromoléculas y para receptores de la superficie celular. Una proteína adhesiva de este tipo, fibronectina, es una glicoproteína grande que comprende dos subunidades unidas por un par de enlaces de disulfuro cerca de las terminaciones carboxi. Cada subunidad se dobla en una serie de dominios similares a varillas entremezclados por regiones de cadenas de polipéptidos flexibles. Cada dominio comprende además módulos de repetición de varios tipos. Un tipo principal de módulo de repetición de fibronectina, llamado repetición de fibronectina tipo III, es de aproximadamente 90 aminoácidos de longitud y ocurre por lo menos 15 veces en cada subunidad. Las repeticiones de fibronectina tipo III tienen repeticiones tripeptídicas de Arg-Gly-Asp (RGD) características que funcionan como sitios

de unión para otras proteínas tales como colágeno, heparina o receptores de la superficie celular. La fibronectina no solo desempeña un papel importante en la adhesión de células a la ECM, sino también en la guía de la migración de células en embriones de vertebrados.

La laminina, otra glicoproteína adhesiva de la ECM, es un constituyente principal (junto con el colágeno tipo IV y otra glicoproteína, nidógeno/entactina) de la lámina basal, una lámina dura de la ECM formada en la base de células epiteliales. La laminina es un complejo flexibles grande, de aproximadamente 850 kD de peso molecular, con tres cadenas de polipéptidos muy largas dispuestas en la forma de una cruz asimétrica mantenida junta con enlaces de disulfuro. La laminina contiene numerosos dominios funcionales, por ejemplo, uno se une al colágeno tipo IV, uno al heparán sulfato, uno a la entactina y dos o más a las proteínas receptoras de laminina en la superficie celular.

1.2 Células Madre

El término “células madre” como se utiliza en este documento se refiere a células no diferenciadas que tienen un alto potencial proliferativo con la capacidad de auto-renovarse que pueden generar células hijas que pueden someterse a la diferenciación terminal en más de un

fenotipo de célula distinto. Las células madre se distinguen de otros tipos de células por dos características. En primer lugar, son células no especializadas capaces de renovarse por sí mismas a través de la división celular, algunas veces después de largos períodos de inactividad. En segundo lugar, bajo ciertas condiciones fisiológicas o experimentales, se pueden inducir a volverse células específicas para tejidos u órganos con funciones especiales. En algunos órganos, tal como los intestinos y la médula ósea, las células madre se dividen regularmente para reparar y reemplazar tejidos desgastados o dañados. En otros órganos, sin embargo, tales como el páncreas y el corazón, las células madre solo se dividen bajo condiciones especiales.

Las células madre embriónicas (EmSC) son células madre derivadas de un embrión que son pluripotentes (es decir, son capaces de diferenciarse in vitro en tipos de células endodérmicas, mesodérmicas y ectodérmicas).

Las células madre adultas (somáticas) son células no diferenciadas que se encuentran entre células diferenciadas en un tejido u órgano. Su papel principal in vivo es mantener y reparar el tejido en el cual se encuentran. Las células madre adultas han sido identificadas en muchos órganos y tejidos, que incluyen el cerebro, médula ósea, sangre periférica, vasos sanguíneos,

músculos esqueléticos, piel, dientes, tracto gastrointestinal, hígado, epitelio ovárico y testículos. Se piensa que las células madre adultas residen en un área específica de cada tejido, conocida como nicho de células madre, donde pueden permanecer inactivas (sin división) durante largos períodos de tiempo hasta que son activadas por una necesidad normal de más células para mantener el tejido, o por una enfermedad o lesión del tejido. Los ejemplos de células madre adultas incluyen, pero no están limitados a, células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimales, células madre neurales, células madre epiteliales y células madre de la piel.

Células Madre Hematopoyéticas (HSC)

Las células madre hematopoyéticas (también conocidas como la unidad formadora de colonias de las células mieloides y linfoides (CFU-M,L) o células CD34+) son células pluripotenciales raras dentro de órganos formadores de sangre que son responsables de la producción continua de células de sangre durante la vida. Mientras que no hay un marcador de la superficie celular individual expresado exclusivamente por las células madre hematopoyéticas, se ha aceptado generalmente que las HSCs de humano tienen el siguiente perfil antigénico: CD34+, CD59+, Thy1+(CD90), CD38bajo/-, C-kit-/bajo y lin-. La CD45

también es un marcador común de las HSCs, excepto las plaquetas y los glóbulos rojos. Las HSCs pueden generar una variedad de tipos de células, que incluyen eritrocitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, plaquetas, mastocitos, monocitos, macrófagos de tejido, osteoclastos y linfocitos T y B. La regulación de células madre hematopoyéticas es un proceso complejo que involucra la auto-renovación, supervivencia y proliferación, compromiso y diferenciación de linaje y es coordinada por diversos mecanismos que incluyen la programación celular intrínseca y estímulos externos, tales como interacciones adhesivas con el estroma micro-ambiental y las acciones de citocinas.

Diferentes factores paracrinos son importantes para causar que las células madre hematopoyéticas se diferencien a lo largo de vías particulares. Los factores paracrinos involucrados en la formación de células sanguíneas y linfocitos son llamados citocinas. Las citocinas pueden ser hechas por varios tipos de células, pero son recolectadas y concentradas por la matriz extracelular de las células estromales (mesenquimales) en los sitios de hematopoyesis. Por ejemplo, el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, por sus siglas en inglés) y el factor de crecimiento multilinaje IL-3 se unen ambos al glicosaminoglicano de heparán sulfato del estroma de la médula ósea. La matriz

extracelular entonces presenta estos factores a las células madre en concentraciones suficientemente altas para unirse a sus receptores.

Células Madre Mesenquimales (MSCs)

Las células madre mesenquimales (MSCs) (también conocidas como células madre estromales de la médula ósea o células madre esqueléticas) son células madre adultas que no son de la sangre encontradas en una variedad de tejidos. Se caracterizan por su forma de husillo morfológicamente; por la expresión de marcadores específicos en su superficie celular; y por su capacidad, bajo condiciones apropiadas, para diferenciarse a lo largo de un mínimo de tres linajes (osteogénico, condrogénico y adipogénico).

No se ha identificado un marcador individual que delinee definitivamente las MSCs in vivo debido a la falta de consenso con respecto al fenotipo de MSC, pero se considera generalmente que las MSCs son positivas para los marcadores de la superficie celular CD105, CD166, CD90 y CD44 y que las MSCs son negativas para antígenos hematopoyéticos típicos, tales como CD45, CD34 y CD14. En cuanto al potencial de diferenciación de las MSCs, los estudios han reportado que poblaciones de MSCs derivadas de la médula ósea tienen la capacidad de desarrollarse en fenotipos mesenquimales diferenciados terminalmente tanto

in vitro como in vivo, que incluyen hueso, cartílago, tendón, músculo, tejido adiposo y estroma de soporte hematopoyético. Los estudios que utilizan ratones transgénicos y genéticamente deficientes y trastornos musculoesqueléticos de humanos han reportado que la MSC se diferencia en múltiples linajes durante el desarrollo embriónico y la homeostasis en adultos.

Los análisis de la diferenciación in vitro de MSCs bajo condiciones apropiadas que recapitulan el proceso in vivo han conducido a la identificación de varios factores esenciales para el compromiso de células madre. Entre éstos, las moléculas secretadas y sus receptores (por ejemplo, factor de crecimiento transformante-β), moléculas de matriz extracelular (por ejemplo, colágenos y proteoglicanos), el citoesqueleto de actina y factores de transcripción intracelular (por ejemplo, Cbfa1/Runx2, PPARγ, Sox9 y MEF2) se ha mostrado que desempeñan papeles importantes en la impulsión del compromiso de MSCs multipotentes en linajes específicos, y el mantenimiento de sus fenotipos diferenciados.

Por ejemplo, se ha mostrado que la osteogénesis de MSCs, tanto in vitro como in vivo, implica múltiples pasos y la expresión de varios factores regulatorios. Durante la osteogénesis, las MSCs multipotentes se someten a la división asimétrica y generan osteoprecursores, los

cuales luego progresan para formar osteoprogenitores, preosteoblastos, osteoblastos funcionales y eventualmente osteocitos. Este progreso de una etapa de diferenciación a la siguiente es acompañado por la activación y la inactivación subsecuente de factores de transcripción, es decir, Cbfa1/Runx2, Msx2, Dlx5, Osx y la expresión de genes marcadores relacionados con el hueso, (es decir, osteopontina, colágeno tipo I, fosfatasa alcalina, sialoproteína ósea y osteocalcina).

También se han mostrado que los miembros de la familia de Wnt impactan la osteogénesis de MSC. Las Wnts son una familia de glicoproteínas ricas en cisteína secretadas que han sido implicadas en la regulación del mantenimiento, proliferación y diferenciación de células madre durante el desarrollo embriónico. La señalización de Wnt canónica incrementa la estabilidad de β-catenina citoplásmica por medio de la inactivación mediada por receptores de la actividad de GSK-3 cinasa y promueve la translocación de β-catenina en el núcleo. El complejo de β-catenina/TCF/LEF activo entonces regula la transcripción de genes involucrados en la proliferación de células. En humanos, las mutaciones en el co-receptor de Wnt LRP5 conducen a una formación defectuosa de huesos. La mutación "ganancia de función" da por resultado una masa ósea alta, mientras que la "pérdida de función" causa una pérdida

total de la resistencia y masa ósea, lo que indica que la señalización de Wnt está involucrada positivamente en la osteogénesis embriónica. La vía de señalización de Wnt canónica también funciona como un mitógeno de células madre a través de la estabilización de β-catenina intracelular y la activación del complejo de transcripción de β-catenina/TCF/LEF, que da por resultado la expresión activada de genes de regulación del ciclo celular, tales como Myc, ciclina D1 y Msx1. Cuando las MSCs se exponen a Wnt3a, una señal de Wnt canónica prototípica, bajo condiciones de medio de crecimiento estándar, muestran una proliferación de células notablemente incrementada y una disminución en la apoptosis, que es consistente con el papel mitogénico de Wnts en células madre hematopoyéticas. Sin embargo, la exposición de MSCs a un medio acondicionado con Wnt3a o la sobreexpresión de Wnt3a ectópico durante la diferenciación osteogénica inhibe la osteogénesis in vitro a través de la regulación por decremento mediada por β-catenina de la actividad de TCF. La expresión de varios genes específicos para osteoblastos, (por ejemplo, fosfatasa alcalina, sialoproteína ósea y osteocalcina), se reduce dramáticamente, mientras que la expresión de Cbfa1/Runx2, un factor de transcripción osteo-inductivo temprano no se altera, lo que significa que la vía de señalización canónica mediada por Wnt3a es necesaria, pero

no suficiente, para bloquear completamente la osteogénesis de MSC. Por otra parte, se ha mostrado que la Wnt5a, un miembro de Wnt no canónico típico, promueve la osteogénesis in vitro. Puesto que la Wnt3a promueve la proliferación de MSC durante la osteogénesis temprana, se piensa probablemente que la señalización de Wnt canónica funciona en el inicio del compromiso osteogénico temprano al incrementar el número de osteoprecursores en el compartimento de células madre, mientras que la Wnt no canónica impulsa el progreso de osteoprecursores a osteoblastos funcionales maduros.

Células Madre Epiteliales

Una membrana epitelial es una lámina multicelular continua compuesta de un epitelio adherido a un tejido conectivo subyacente. Las membranas epiteliales pueden ser cutáneas (por ejemplo piel), mucosas (por ejemplo, revestimiento gastrointestinal) y/o serosas (por ejemplo revestimiento pleural, revestimiento pericárdico y revestimiento peritoneal).

Las células madre epiteliales revisten el tracto gastrointestinal en criptas profundas y dan origen a células absorbentes, células caliciformes, células de Paneth y células entero-endocrinas.

Componentes del Tracto Gastrointestinal de Humano

El tracto gastrointestinal es un tubo continuo que se extiende desde la boca hasta el ano. En un nivel ordinario, el tracto gastrointestinal está compuesto de los siguientes órganos: la boca, la mayor parte de la faringe, el esófago, el estómago, el intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) y el intestino grueso. Cada segmento del tracto gastrointestinal participa en procesos de absorción esenciales para la digestión al producir sustancias químicas que facilitan la digestión de alimentos ingeridos por vía oral, líquidos y otras sustancias tales como agentes terapéuticos.

Dentro del tracto gastrointestinal, el intestino delgado, el sitio de mayor digestión y absorción, está estructurado específicamente para estas funciones importantes. El intestino delgado se divide en tres segmentos: el duodeno, el yeyuno y el íleon. Las células absorbentes del intestino delgado producen varias enzimas digestivas llamadas las enzimas de “borde en cepillo”. Junto con los jugos pancreáticos e intestinales, estas enzimas facilitan la absorción de sustancias del quimo en el intestino delgado. El intestino grueso, la porción terminal del tracto gastrointestinal, contribuye a la terminación de la absorción, la producción de ciertas vitaminas, y la formación y expulsión de heces.

A nivel celular, el epitelio es una capa de tejido avascular puramente celular que cubre todas las superficies libres (cutánea, mucosa y serosa) del cuerpo, inclusive las glándulas y otras estructuras derivadas del mismo. Reviste tanto el exterior del cuerpo, como la piel, así como también las cavidades interiores y el lumen del cuerpo. Mientras que la capa más hacia el exterior de la piel humana está compuesta de células epiteliales queratinizadas, escamosas estratificadas muertas, las membranas mucosas que revisten el interior de la boca, el esófago y partes del recto son por sí mismas revestidas por epitelio escamoso estratificado no queratinizado. Las líneas de células epiteliales están presentes dentro de los pulmones, el tracto gastrointestinal y los tractos reproductivo y urinario, y forman glándulas exocrinas y endocrinas.

Las células epiteliales están involucradas en la secreción, absorción, protección, transporte transcelular, detección de sensaciones y permeabilidad selectiva. Existen variaciones en las estructuras y funciones celulares en el epitelio por todo el tracto gastrointestinal. El epitelio en la boca, faringe, esófago y canal anal es principalmente un epitelio escamoso, no queratinizado, protector. El epitelio del estómago está compuesto de (i) células columnares simples que participan en la absorción y

secreción de nutrientes y fluidos, (ii) células caliciformes productoras de moco que participan en funciones protectoras y mecánicas y (iii) células entero-endocrinas que participan en la secreción de hormonas gastrointestinales. Adicionalmente, dentro del intestino, el revestimiento epitelial proporciona una barrera de defensa importante contra agentes patógenos microbianos.

El desarrollo de epitelio intestinal implica tres fases principales: 1) una fase temprana de proliferación epitelial y morfogénesis; 2) un período intermedio de diferenciación celular en el cual aparece la característica distintiva del tipo de células del epitelio intestinal; y 3) una fase final de maduración bioquímica y funcional. Las criptas intestinales, localizadas en la base de los vellos, contienen células madre las cuales proveen a la superficie completa de células epiteliales con una variedad de subtipos de células epiteliales. Estas células especializadas proporcionan una interfaz de ambiente externo-ambiente interno, secreción y reabsorción de iones y fluidos, reconocimiento de antígenos, secreción de hormonas y protección de la superficie. La exposición de células epiteliales sobre las superficies del lumen intestinal las sujeta a una amplia variedad de agresiones, que incluyen fuerzas microbianas, químicas y físicas; de esta manera también pueden contribuir al deterioro pato-

fisiológico en enfermedades. Adicionalmente, estas células son objetivos para la inflamación, infección y transformación maligna.

Dentro del tracto intestinal, el epitelio se forma con la diferenciación de células madre.

Marcadores Moleculares de Células Madre Epiteliales Gastrointestinales

Como se plantea en la solicitud publicada de los Estados Unidos No. 2009/0269769, la cual se incorpora en este documento a manera de referencia en su totalidad, no hay marcadores moleculares aceptados universalmente que identifiquen células madre gastrointestinales. Sin embargo, varios marcadores han sido utilizados para identificar células madre en tejidos del intestino delgado e intestino grueso. Estos incluyen: β-1-integrina, mushashi-1, CD45 y citoqueratina.

La CD45, también llamada el antígeno de leucocitos común, T220 y B220 en ratones, es una proteína transmembrana con actividad de proteína tirosina fosfatasa (PTP) citoplásmica. La CD45 se encuentra en células hematopoyéticas excepto eritrocitos y plaquetas. La CD45 tiene varias isoformas que se pueden ver en las diversas etapas de diferenciación de células hematopoyéticas normales.

Mushashi-1 es un marcador antigénico de desarrollo temprano de células madre y células precursoras de células gliales/neuronales.

La β-1-integrina (CD29, receptor de fibronectina), es una β-subunidad de un miembro de proteína heterodimérica de la familia de integrina de las proteínas; las integrinas son receptores de la membrana implicados en la adhesión y reconocimiento de células.

Las citoqueratinas son proteínas filamentosas intermedias que se encuentran en el citoesquelético intracitoplásmico de células que comprenden tejido epitelial.

Existen cuatro linajes principales de células epiteliales: (i) células epiteliales columnares, (ii) células caliciformes, (iii) células cromafinas entero-endocrinas y (iv) células de Paneth. Varios marcadores moleculares han sido utilizados para identificar cada uno de estos linajes.

Los marcadores utilizados para identificar células epiteliales columnares incluyen: fosfatasa alcalina intestinal (ALP1), sucrosa isomaltasa (SI), co-transportador de sodio/glucosa (SLGT1), dipeptidil-peptidasa-4 (DPP-4) y CD26. La fosfatasa alcalina intestinal (E.C. 3.1.3.1) es una enzima unida a la membrana que se localiza en el borde en cepillo de enterocitos en el

epitelio intestinal de humano. La sucrosa-isomaltasa (SI, EC 3.2.1.48) es una disacaridasa de membrana de borde en cepillo del intestino delgado específica para enterocitos. La dipeptidil-peptidasa-4 (E.C. 3.4.14.5) es una peptidasa de tipo serina unida a la membrana. El transportador de sodio/glucosa (SGLT) media el transporte de glucosa dentro de células epiteliales. El SGLT pertenece a la familia de co-transportadores de sodio/glucosa SLCA5. Dos diferentes isoformas de SGLT, SGLT1 y SGLT2, median la reabsorción de glucosa tubular renal en humanos. Ambos se caracterizan por su afinidad hacia diferentes substratos. El SGLT1 transporta glucosa, así como también galactosa y es expresado tanto en el riñón como en el intestino. El SGLT2 transporta glucosa y se cree que es responsable de 98% de la reabsorción de glucosa; el SGLT2 se encuentra generalmente en los segmentos S1 y S2 del túbulo próximo del nefrón. La CD26 es una proteína multifuncional de 110 KDa expresada considerablemente en células epiteliales (túbulos próximos del riñón, intestino y conducto biliar) y en varios tipos de células endoteliales y fibroblastos y en subconjuntos de leucocitos.

Los marcadores utilizados para identificar células caliciformes incluyen mucina 2 (MUC2) y factor trimérico 3 (TFF3). La mucina-2, una mucina formadora de gel secretada, es la mucina formadora de gel principal

secretada por células caliciformes de los intestinos delgado y grueso y es el componente estructural principal del gel mucoso. El factor trimérico intestinal 3 es una proteína diferente de mucina y un producto de células calciformes completamente diferenciadas.

Los marcadores utilizados para identificar células cromafinas entero-endocrinas incluyen cromogranina A (CHGA) y sinaptofisina (SYP). La cromogranina A (CHGA) y sus péptidos derivados, los cuales se almacenan y se liberan de gránulos secretores de núcleo denso de células neuroendocrinas, han sido implicados como que desempeñan múltiples papeles en los sistemas endocrino, cardiovascular y nervioso. La sinaptofisina I (SYP) es una proteína de membrana de la vesícula sináptica que es expresada de manera ubicua por todo el cerebro sin una función sináptica definida.

Los marcadores utilizados para identificar células de Paneth incluyen lisozima (LYZ), defensina (DEFA1) y metalopeptidasa de matriz 7 (MMP7). La lisozima (LYZ o muramidasa) (E.C. 3.2.1.17) cataliza la hidrólisis de 1,4-beta-enlaces entre ácido N-acetilmurámico y residuos de N-acetil-D-glucosamina en un peptidoglicano y entre residuos de N-acetil-D-glucosamina en quitodextrinas. Las defensinas (DEFA1) son péptidos pequeños que son producidos por leucocitos y células epiteliales. La defensina de

humano α-1 es un péptido de 30 aminoácidos, 3.5 kDa que ha mostrado funciones efectoras en la inmunidad innata del hospedante contra algunos microorganismos. Las metaloproteinasas de matriz (MMPs) son una familia de enzimas dependientes de metal que son responsables de la degradación de componentes de la matriz extracelular. Las MMPs están involucradas en varios procesos fisiológicos, tales como embriogénesis y remodelación de tejido y también desempeñan un papel en la invasión y metástasis de células tumorales, las cuales requieren proteólisis de membranas basales y matriz extracelular.

Células Madre Neurales

El cerebro de mamífero adulto contiene células madre neurales multipotentes (NSCs) que tienen la capacidad de auto-renovarse y son responsables de la neurogénesis y el mantenimiento de regiones específicas del cerebro de adultos. Las células madre neurales pueden generar astrocitos, oligodendrocitos y neuronas. La auto-renovación y la diferenciación de células madre neurales son dirigidas por interacciones dentro de una red compleja de reguladores intrínsecos y factores extrínsecos. Los análisis proteómicos recientes han identificado una multitud de factores de transcripción que pertenecen a las vías de Wnt/β-catenina, Notch y Sonic Hedgehog (shh), además de

modificaciones epigenéticas, redes de microARN y redes de factores de crecimiento extrínsecos, que incluyen pero no están limitados a FGFs y BMPs. (Yun *y colaboradores*, 2010, J. Cell. Physiol. 225: 337-347).

Con la llegada de tecnologías de micromatriz y proteómicas de alto rendimiento, se ha identificado una variedad de diferentes firmas moleculares de células madre neurales, que incluyen pero no están limitadas a CD133/promini, nestina, NCAM, el factor de transcripción de caja de HMG, Sox2 y la proteína de bHLH, Olig2. (Holmberg y colaboradores, 2011, PLoS One., 6(3): e18454; Hombach-Klonisch y colaboradores, 2008, J. Mol. Med. 86(12):1301-1314).

Células Madre de la Piel

Varias poblaciones de células madre adultas diferentes con distintas firmas moleculares son responsables del mantenimiento de la homeostasis de la piel. Éstas incluyen, pero no están limitadas a, células madre epidérmicas de la región interfolicular, células madre epidérmicas del folículo piloso (también conocidas como las células madre abultadas), células madre dérmicas, células madre de papilas dérmicas y células madre sebáceas. Las células madre epidérmicas son de origen ectodérmico mientras que las células madre dérmicas se originan del

mesodermo y son de naturaleza mesenquimal. (Zouboulis y colaboradores, 2008, Exp. Gerontol., 43: 986-997).

Las células madre epidérmicas interfoliculares residen en la capa basal de la epidermis y dan origen a queratinocitos, los cuales emigran a la superficie de la piel y forman una capa protectora. Una variedad diversa de firmas moleculares se ha descrito para estas células madre epidérmicas que incluyen pero no están limitadas a niveles de expresión altos de α6-integrina, bajos de CD71, altos de Delta 1 (ligando de señalización de Notch) y altos de CD200. Las células madre foliculares localizadas en la base de los folículos pilosos dan origen a tanto el folículo piloso como a la epidermis. Estos se caracterizan por la inmunotinción de Citoqueratina 15 (K15) y altos niveles de β1-integrina. Las proteínas marcadoras de células madre dérmicas incluyen, pero no están limitadas a nestina, fibronectina y vimentina, los marcadores superficiales para las células madre de papilas dérmicas incluyen marcadores de células madre mesenquimales tales como por ejemplo CD44, CD73 y CD90 y las células madre sebáceas expresan queratina 14. (Zouboulis y colaboradores, 2008, Exp. Gerontol., 43: 986-997).

Además, las células somáticas adultas pueden ser reprogramadas para entrar en un estado similar a células madre embriónicas al ser forzadas a expresar un conjunto de

factores de transcripción, por ejemplo, Oct-3/4 (o Pou5f1, el factor de transcripción octamérico-3/4), la familia de Sox de factores de transcripción (por ejemplo, Sox-1, Sox-2, Sox-3 y Sox-15), los factores de transcripción de la familia de Klf (Klf-1, Klf-2, Klf-4 y Klf-5) y la familia Myc de factores de transcripción (por ejemplo, c-Myc, N-Myc y L-Myc). Por ejemplo, las células madre pluripotentes inducibles de humano (iPSCs, por sus siglas en inglés) son células reprogramadas para expresar factores de transcripción que expresan marcadores de células madre y son capaces de generar células características de las tres capas germinales (es decir, ectodermo, mesodermo y endodermo).

1.3. Nichos de Células Madre

Los compartimentos de tejido adultos contienen nichos endógenos de células madre adultas que son capaces de diferenciarse en diversos linajes de células de destino endodérmico, mesodérmico o ectodérmico determinado dependiendo de su ubicación en el cuerpo. Por ejemplo, en presencia de un conjunto apropiado de señales internas y externas, las células madre hematopoyéticas adultas derivadas de la médula ósea (HSCs) tienen el potencial para diferenciarse en células sanguíneas, endoteliales, hepáticas y musculares; las células madre neurales

derivadas del cerebro (NSCs) tienen el potencial para diferenciarse en neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y células sanguíneas; las células madre epiteliales adultas derivadas del intestino y la epidermis (EpSCs) tienen el potencial para dar origen a células de las criptas epiteliales y capas epidérmicas; las células madre derivadas de tejido adiposo (ASCs) tienen el potencial para dar origen a células de grasa, músculo, cartílago, endoteliales, células similares a neuronas y osteoblastos; y las células madre mesenquimales adultas derivadas de la médula ósea (MSCs) tienen el potencial para dar origen a células de huesos, cartílagos, tendones, adiposas, musculares, estromales de la médula ósea y neurales.

Las células madre adultas endógenas se incorporan dentro del componente de ECM de un compartimiento de tejido determinado, el cual, junto con células de soporte, forma el nicho celular. Estos nichos celulares dentro del andamio de ECM junto con el microambiente circundante contribuyen a señales bioquímicas y físicas importantes, que incluyen factores de crecimiento y factores de transcripción requeridos para iniciar la diferenciación de células madre en células precursoras comprometidas y la maduración de células precursoras subsecuentes para formar células de tejido adultas con características fenotípicas y funcionales especializadas.

Marcadores de Células Madre

El recubrimiento de la superficie de cada célula en el cuerpo es de proteínas especializadas ("receptores") capaces de unirse o adherirse selectivamente a otras moléculas "de señalización". Normalmente, las células utilizan estos receptores y las moléculas que se unen a los mismos como una manera de comunicarse con otras células y para llevar a cabo sus funciones apropiadas en el cuerpo. Estos receptores de la superficie celular son los marcadores de células madre. Cada tipo de célula tiene una cierta combinación de receptores sobre su superficie que las hace distinguibles de otras clases de células.

La agrupación de un sistema de diferenciación (CD) es un protocolo utilizado para la identificación de moléculas de la superficie celular. Las moléculas de CD pueden actuar de numerosas maneras, actuando frecuentemente como receptores o ligandos; por lo cual se inicia una cascada de señales, que altera el comportamiento de la célula. Algunas proteínas de CD no desempeñan un papel en la señalización de células, sino que tienen otras funciones, tales como la adhesión de células. Generalmente, a una molécula de la superficie propuesta se le asigna un número de CD una vez que dos anticuerpos monoclonales específicos (mAb) se muestra que

se unen a la molécula. Si la molécula no ha sido bien caracterizada, o solo tiene un mAb, a la molécula se da usualmente el indicador provisional “w”.

La nomenclatura del sistema de CD utilizada comúnmente para identificar marcadores de células permite de esta manera que las células sean definidas con base en que moléculas están presentes sobre su superficie. Estos marcadores se utilizan frecuentemente para asociar células con ciertas funciones. Mientras que el uso de una molécula de CD para definir poblaciones no es común, la combinación de marcadores ha permitido tipos de células con definiciones muy específicas. Más de 350 moléculas de CD han sido identificadas para los humanos.

Las moléculas de CD se utilizan en la clasificación de células utilizando varios métodos, que incluyen la citometría de flujo. Las poblaciones de células se definen usualmente utilizando un símbolo “+” o “-” para indicar si una cierta fracción de célula expresa o carece de una molécula de CD particular.

La Tabla 2 identifica marcadores utilizados comúnmente para identificar células madre y para caracterizar tipos de células diferenciados:

Tabla 2. Marcadores de la superficie de Células Madre Utilizados Comúnmente y Tipos de Células Diferenciados Correspondientes

Nombre del Marcador	Tipo de Célula	Importancia
Vaso Sanguíneo		
Cinasa-1 hepática fetal (Flk1)	Endotelial	Proteína receptora de la superficie celular que identifica un progenitor de células endoteliales; marcador de contactos de célula-célula
Cadena pesada de miosina específica para células de músculo liso	Músculo liso	Identifica células de músculo liso en la pared de los vasos sanguíneos
Caderina de células endoteliales vasculares	Músculo liso	Identifica células de músculo liso en la pared de los vasos sanguíneos
Hueso		
Fosfatasa alcalina específica para huesos (BAP)	Osteoblasto	Enzima expresada en osteoblasto; la actividad indica la formación de huesos
Hidroxiapatita	Osteoblasto	Matriz ósea mineralizada que proporciona integridad estructural; marcador de la formación de huesos
Osteocalcina (OC)	Osteoblasto	Proteína que se une a minerales sintetizada por osteoblasto; marcador de la formación de huesos
Médula Ósea y Sangre		
Receptor de la proteína	Células madre mesenquimales y	Importante para la diferenciación de tipos de células mesenquimales comprometidas de

morfogenética ósea (BMPR)	progenitoras	células madre mesenquimales y progenitoras; el BMPR identifica linajes mesenquimales tempranos (células madre y progenitoras)
CD4 y CD8	Glóbulos blancos (WBC)	Marcadores de proteínas de la superficie celular específicos para linfocitos T maduros (subtipo de WBC)
CD34	Célula madre hematopoyética (HSC), satélite, progenitor endotelial	Proteína de la superficie celular sobre célula de médula ósea, indicativa de una HSC y progenitor endotelial; la CD34 también identifica satélite muscular, una célula madre muscular
Perfil $CD34^{+}Sca1^{+}$ Lin^{-}	Célula madre mesenquimal (MSC)	Identifica las MSCs, las cuales pueden diferenciarse en adipocito, osteocito, condrocito y miocito
CD38	Ausente en HSC Presente en linajes de WBC	Molécula de la superficie celular que identifica linajes de WBC. La selección de células $CD34^{+}/CD38^{-}$ permite la purificación de poblaciones de HSC
CD44	Mesenquimal	Un tipo de molécula de adhesión celular utilizada para identificar tipos específicos de células mesenquimales
c-kit	HSC, MSC	Receptor de la superficie celular en tipos de células BM que identifica HSC y MSC; la unión por medio de suero bovino fetal (FCS) aumenta la proliferación de células ES, HSCs, MSCs y células progenitoras hematopoyéticas

Unidad formadora de colonias (CFU)	HSC, progenitor de MSC	Un ensayo de CFU detecta la capacidad de una célula madre o célula progenitora individual para dar origen a uno o más linajes de células, tales como linajes de glóbulos rojos (RBC) y/o glóbulos blancos (WBC)
Médula Ósea y Sangre		
Unidad formadora de colonias de fibroblastos (CFU-F)	Fibroblasto de médula ósea	Una célula de médula ósea individual que ha dado origen a una colonia de células fibroblásticas multipotentes; estas células identificadas son precursores de linajes mesenquimales diferenciados
Tinte Hoechst	Ausente en HSC	Tinte fluorescente que se une al ADN; la HSC extruye el tinte y se tiñe ligeramente en comparación con otros tipos de células
Antígeno común de leucocito CD45)	WBC	Proteína de la superficie celular sobre un progenitor de WBC
Antígeno de la superficie de linaje (Lin)	Linajes de HSC, MSC Diferenciado a RBC y WBC	De trece a catorce diferentes proteínas de la superficie celular que son marcadores de linajes de células sanguíneas maduras; la detección de células Lin-negativas ayuda en la purificación de poblaciones de HSC y progenitores hematopoyéticos
Mac-1	WBC	Proteína de la superficie celular específica para granulocito y macrófago maduro (subtipos de WBC)

Muc-18 (CD146)	Fibroblastos de médula ósea, endoteliales	Proteína de la superficie celular (superfamilia de inmunoglobulina) encontrada en fibroblastos de médula ósea, la cual puede ser importante en la hematopoyesis; una subpoblación de células Muc-18+ son precursores mesenquimales
Antígeno de células madre (Sca-1)	HSC, MSC	Proteína de la superficie celular en célula de médula ósea (BM), indicativa del cont. en Médula Ósea y Sangre de HSC y MSC
Antígeno Stro-1	Células precursoras estromales (mesenquimales), células hematopoyéticas	Glicoproteína de la superficie celular en subconjuntos de células estromales (mesenquimales) de médula ósea; la selección de células Stro-1+ ayuda en el aislamiento de células precursoras mesenquimales, las cuales son células multipotentes que dan origen a adipocitos, osteocitos, miocitos lisos, fibroblastos, condrocitos y células sanguíneas
Thy-1	HSC, MSC	Proteína de la superficie celular; negativa o la detección baja es sugestiva de HSC
Cartílago		
Colágeno tipos II y IV	Condrocito	Proteínas estructurales producidas específicamente por condrocito
Queratina	Queratinocito	Proteína principal de la piel; identifica un queratinocito diferenciado
Proteoglicano sulfatado	Condrocito	Molécula encontrada en tejidos conectivos; sintetizada por condrocito

Grasa		
Proteína que se une a lípidos de adipocitos (ALBP)	Adipocito	Proteína que se une a lípidos localizada específicamente en adipocito
Trasportador de ácidos grasos (FAT)	Adipocito	Molécula de transporte localizada específicamente en adipocito
Proteína que se une a lípidos de adipocitos (ALBP)	Adipocito	Proteína que se une a lípidos localizada específicamente en adipocito
Perilipina A	Adipocito	Proteína asociada con adipocitos maduros
Hígado		
Albúmina	Hepatocito	Proteína principal producida por el hígado; indica el funcionamiento de hepatocitos madurando y completamente diferenciados
Integrina B-1	Hepatocito	Molécula de adhesión celular importante en interacciones de célula-célula; marcador expresado durante el desarrollo del hígado
Sistema Nervioso		
CD133	Célula madre neural, HSC	Proteína de la superficie celular que identifica células madre neurales, la cual da origen a neuronas y célula gliales
Proteína ácida fibrilar glial (GFAP)	Astrocito	Proteína producida específicamente por astrocito
Proteína asociada con microtúbulos-2	Neurona	MAP específica para dendrocitos; proteína encontrada específicamente en la ramificación

(MAP-2)		dendrítica de una neurona
Proteína básica mielínica (MPB)	Oligodendrocito	Proteína producida por oligodendrocitos maduros; localizada en la vaina mielínica que rodea estructuras neuronales
Nestina	Progenitor neural	Proteína estructural filamentosa intermedia expresada en tejido neural primitivo
Tubulina neural	Neurona	Proteína estructural importante para una neurona; identifica una neurona diferenciada
Neurofilamento (NF)	Neurona	Proteína estructural importante para una neurona; identifica una neurona diferenciada
Sistema Nervioso		
Neuroesfera	Cuerpo Embrioide (EB), ES	Agrupación de células neurales primitivas en cultivo de células ES en diferenciación; indica la presencia de neuronas tempranas y glía
Noggin	Neurona	Un gen específico para neuronas expresado durante el desarrollo de neuronas
O4	Oligodendrocito	Marcador de la superficie celular en un oligodendrocito en desarrollo, inmaduro
O1	Oligodendrocito	Marcador de la superficie celular que caracterizada un oligodendrocito maduro
Sinaptofisina	Neurona	Proteína neuronal localizada en sinapsis; indica conexiones entre neuronas
Tau	Neurona	Tipo de MAP; ayuda a mantener la estructura del axón

Páncreas		
Citoqueratina 19 (CK19)	Epitelio pancreático	La CK19 identifica células epiteliales pancreáticas específicas que son progenitoras para células de los islotes y células ductales
Glucagón	Islote pancreático	Expresado por una alfa-célula de los islotes del páncreas
Insulina	Islote pancreático	Expresada por una beta-célula de los islotes del páncreas
Factor promotor de insulina-1 (PDX-1)	Islote pancreático	Factor de transcripción expresado por una beta-célula de los islotes del páncreas
Nestina	Progenitor pancreático	Proteína filamentosa estructural indicativa de líneas de células progenitoras que incluyen células pancreáticas
Polipéptido pancreático	Islote pancreático	Expresado por una gamma-célula de los islotes del páncreas
Somatostatina	Islote pancreático	Expresada por una delta-célula de los islotes del páncreas
Células Madre Pluripotentes		
Fosfatasa alcalina	Célula madre embriónica (ES), carcinoma embrional (EC)	La expresión elevada de esta enzima está asociada con una célula madre pluripotente no diferenciada (PSC)
Alfa-fetoproteína (AFP)	Endodermo	Proteína expresada durante el desarrollo del endodermo primitivo; refleja Células Madre Pluripotentes de diferenciación de endodermo

Proteína morfogenética ósea-4	Mesodermo	Factor de crecimiento y diferenciación expresado durante la formación y diferenciación de mesodermo temprano
Brachyury	Mesodermo	Factor de transcripción importante en las fases tempranas de formación y diferenciación de mesodermo; utilizado como indicador más temprano de la formación de mesodermo
Designación de agrupación 30 (CD30)	ES, EC	Molécula receptora de la superficie encontrada específicamente en PSC
Cripto (TDGF-1)	ES, cardiomiocito	Gen para el factor de crecimiento expresado por células ES, ectodermo primitivo y cardiomiocito en desarrollo
Gen de GATA-4	Endodermo	La expresión incrementa conforme la ES se diferencia en endodermo
GCTM-2	ES, EC	Anticuerpo para una molécula de matriz extracelular específica que es sintetizado por PSCs no diferenciadas
Génesis	ES, EC	Factor de transcripción expresado de manera única por células ES ya sea en o durante el estado no diferenciado de PSCs
Factor nuclear de células germinales	ES, EC	Factor de transcripción expresado por PSCs
Factor nuclear de hepatocitos-4 (HNF-4)	Endodermo	Factor de transcripción expresado temprano en la formación de endodermo

nestina	Ectodermo, progenitor neural y pancreático	Filamentos intermedios dentro de células; característico de la formación de neuroectodermo primitivo
Molécula de adhesión celular neuoronal (N-CAM)	Ectodermo	Molécula de la superficie celular que promueve la interacción célula-célula; indica la formación de neuroectodermo primitivo
Células Madre Pluripotentes		
OCT4/POU5F1	ES, EC	Factor de transcripción único para PSCs; esencial para el establecimiento y mantenimiento de PSCs no diferenciadas
Pax6	Ectodermo	Factor de transcripción expresado conforme una célula ES se diferencia en neuroepitelio
Antígeno embriónico específico para etapas-3 (SSEA-3)	ES, EC	Glicoproteína expresada específicamente en el desarrollo embriónico temprano y por PSCs no diferenciadas
Antígeno embriónico específico para etapas-4 (SSEA-4)	ES, EC	Glicoproteína expresada específicamente en el desarrollo embriónico temprano y por PSCs no diferenciadas
Factor de células madre (ligando de SCF o c-Kit)	ES, EC, HSC, MSC	Proteína de la membrana que aumenta la proliferación de células ES y EC, célula madre hematopoyética (HSCs) y células madre mesenquimales (MSCs); se une al receptor c-Kit
Telomerasa	ES, EC	Una enzima asociada de manera única con líneas de células inmortales; útil para identificar PSCs no diferenciadas

TRA-1-60	ES, EC	El anticuerpo para una molécula de matriz extracelular específica es sintetizado por PSCs no diferenciadas
TRA-1-81	ES, EC	Anticuerpo para una molécula de matriz extracelular específica sintetizado normalmente por PSCs no diferenciadas
Vimentina	Ectodermo, progenitor neural y pancreático	Filamentos intermedios dentro de células; característica de la formación de neuroectodermo primitivo
Músculo Esquelético/Músculo Cardíaco/Liso		
MyoD y Pax7	Mioblasto, miocito	Factores de transcripción que dirigen la diferenciación de mioblastos en miocitos maduros
Miogenina y MR4	Miocito esquelético	Factores de transcripción secundarios requeridos para la diferenciación de mioblastos de células madre musculares
Cadena pesada de miocina	Cardiomiocito	Un componente de una proteína estructural y contráctil encontrada en un cardiomiocito
Cadena ligera de miocina	Miocito esquelético	Un componente de una proteína estructural y contráctil encontrada en un miocito esquelético

La Tabla 3 muestra los marcadores utilizados comúnmente que son empleados por artífices expertos para identificar y caracterizar tipos de glóbulos blancos diferenciados:

Tabla 3. Lista de Marcadores de la Superficie en Tipos de Glóbulos Blancos

Tipo de Célula	Marcadores de CD
Células madre	CD34+,CD31-
Todos los grupos de leucocitos	CD45+
Granulocito	CD45+,CD15+
Monocito	CD45+,CD14+
Linfocito T	CD45+,CD3+
Célula auxiliar T	CD45+,CD3+,CD4+
Célula T citotóxica	CD45+,CD3+,CD8+
Linfocito B	CD45+,CD19+ o CD45+,CD20+
Trombocito	CD45+,CD61+
Célula asesinas naturales	CD16+,CD56+,CD3-

La Tabla 4 correlaciona el perfil de expresión de proteínas ejemplar de células madre derivadas de adipocitos (ASCs) con los marcadores de la superficie correspondientes (Flynn *y colaboradores*, 2208 Organogenesis, 4(4): 228-235; Gronthos *y colaboradores*, 2011, J. Cell. Physiol., 189: 54-63).

Tabla 4. Expresión de Proteínas de Células Madre Derivadas de Adipocitos y Perfil de Marcador de la Superficie

Clase	Proteína	Marcador
Célula de Adhesión	Integrina β_1	CD29
	Integrina α_4	$CD49_d$

Clase	Proteína	Marcador
	Integrina a_a	$CD49_e$
	Molécula de Adhesión Celular Vascular	VCAM; CD106
	Molécula de Adhesión Intracelular-1	ICAM; CD54
	Molécula de Adhesión Celular de Leucocito Activado	ALCAM; CD166
	Tetraspano	CD9
	Endoglina	CD105
	Muc18	CD146
Receptores	Receptor de hialuronato	CD44
	Receptor de transferrina	CD71
	Receptor de insulina	
	Receptor de glucocorticoide	
	Receptor de triyodotironina (T3)	
	Receptor de ácido retinoico	
ECM	Colágeno tipo 1	
	Colágeno tipo III	
	Colágeno tipo IV	
	Colágeno tipo VI	CD68
	Osteopontina	
	Osteonectina	
	Laminina	
	Elastina	
	Fibronectina	

Clase	Proteína	Marcador
	Proteoglicano de heparán sulfato	
Citoesqueleto	Actina de músculo liso-A	
	Vimentina	
Otro	HLA-ABC	Antígeno del complejo principal de histocompatibilidad clase 1
	DAF	CD55
	Protectina de complemento	CD59

El CD3 (complejo de TCR) es un complejo de proteínas compuesto de cuatro cadenas distintas. En los mamíferos, el complejo contiene una cadena de CD3γ, una cadena de CD3δ y dos cadenas de CD3ε, las cuales se asocian con el receptor de células T (TCR) y la cadena-ζ para generar una señal de activación en linfocitos T. Conjuntamente, el TCR, la cadena-ζ y las moléculas de CD3 comprenden el complejo de TCR. Las colas intracelulares de moléculas de CD3 contienen una configuración conservada conocida como la configuración de activación basada en tirosina de inmunorreceptor (ITAM), la cual es esencial para la capacidad de señalización del TCR. Con la fosforilación de la ITAM, la cadena de CD3 puede unirse a ZAP70 (proteína asociada zeta), una cinasa involucrada en

la cascada de señalización de la célula T.

Las integrinas son receptores que median la unión entre una célula y los tejidos que la rodean y están involucradas en interacciones de célula-célula y célula-matriz. En los mamíferos, 18 subunidades α y 8 subunidades β han sido caracterizadas. Las subunidades tanto α como β contienen dos colas separadas, las cuales penetran ambas la membrana plasmática y poseen pequeños dominios citoplásmicos.

La integrina αM (ITGAM; CD11b; antígeno de macrófago-1 (Mac-1); receptor del complemento 3 (CR3)) es una subunidad de proteína de la molécula de integrina heterodimérica αMβ2. La segunda cadena de αMβ2 es la subunidad de integrina β2 común (CD18). La αMβ2 es expresada sobre la superficie de muchos leucocitos que incluyen monocitos, granulocitos, macrófagos y células asesinas naturales. Se cree generalmente que la αMβ2 media la inflamación al regular la adhesión y migración de leucocitos. Además, se piensa que las αMβ2 tiene un papel en la fagocitosis, citotoxicidad mediada por células, quimiotáxis y activación celular, así como también que está involucrada en el sistema del complemento debido a su capacidad para unirse al componente del complemento inactivado 3b (iC3b). La subunidad de ITGAM de la integrina αMβ2 está involucrada directamente en la causalidad de la

adhesión y propagación de células, pero no puede mediar la migración celular sin la presencia de la subunidad β2 (CD18).

La CD14 es una proteína de la superficie celular expresada principalmente por macrófagos y, a un grado menor, granulocitos neutrófilos. Las células CD14+ son monocitos que pueden diferenciarse en un hospedante de diferentes células; por ejemplo, la diferenciación a células dendríticas es promovida por citocinas tales como GM-CSF e IL-4. La CD14 actúa como un co-receptor (junto con un receptor de tipo toll (TLR) 4 y el antígeno de linfocitos 96 (MD-2)) para la detección de un lipopolisacárido bacteriano (LPS). La CD14 solo puede unirse a LPS en presencia de una proteína de unión a lipopolisacáridos (LBP).

La CD15 (3-fucosil-N-acetil-lactosamina; antígeno embriónico específico para etapas 1 (SSEA-1)) es una molécula de adhesión de carbohidratos que puede ser expresada en glicoproteínas, glicolípidos y proteoglicanos. La CD15 se encuentra comúnmente en neutrófilos y media la fagocitosis y la quimiotáxis.

La CD16 es un receptor de Fc (FcγRIIIa y FcγRIIIb) encontrado en la superficie de células asesinas naturales, leucocitos polimorfonucleares neutrófilos, monocitos y macrófagos. Los receptores de Fc se unen a la porción Fc de

anticuerpos de IgG.

La CD19 es una proteína de humano expresada en células dendríticas foliculares y células B. Esta molécula de la superficie celular se ensambla con el receptor de antígenos de linfocitos B con el propósito de disminuir el umbral para la estimulación dependiente de receptores de antígenos. Se cree generalmente que, con la activación, la cola citoplásmica de CD19 se fosforila, lo cual que permite la unión por cinasas de la familia de Src y el reclutamiento de fosfoinositida 3 (PI-3) cinasas.

La CD20 es una fosfoproteína no glicosilada que es expresada en la superficie de todas las células B maduras. Los estudios sugieren que la CD20 desempeña un papel en el desarrollo y la diferenciación de células B en células plasmáticas. La CD20 es codificada por un miembro de la familia de genes 4A que abarcan la membrana (MS4A). Los miembros de esta familia de proteínas se caracterizan por cualidades estructurales comunes y exhiben patrones de expresión únicos entre las células hematopoyéticas y los tejidos no linfoides.

La CD31 (molécula de adhesión de plaquetas/células endoteliales; PECAM1) se encuentran normalmente en células endoteliales, plaquetas, macrófagos y células de Kupffer, granulocitos, células T, células asesinas naturales, linfocitos, megacariocitos,

osteoclastos y neutrófilos. La CD31 tiene un papel clave en la regeneración de tejidos y en la remoción de manera segura de neutrófilos del cuerpo. Con el contacto, las moléculas de CD31 de macrófagos y neutrófilos se utilizan para comunicar el estado de salud del neutrófilo al macrófago.

La CD34 es una glicoproteína de la superficie celular monomérica encontrada normalmente en células hematopoyéticas, células progenitoras endoteliales, células endoteliales de vasos sanguíneos y mastocitos. La proteína de CD34 es un miembro de una familia de proteínas de sialomucina transmembrana de paso individual y funciona como un factor de adhesión de célula-célula. Los estudios sugieren que la CD34 también puede mediar la unión de células madre a la matriz extracelular de la médula ósea o directamente a las células estromales.

La CD44 (el "receptor de hialuronano"), una glicoproteína de la superficie celular involucrada en interacciones de célula-célula, adhesión y migración de células, se utiliza para identificar tipos específicos de células mesenquimales.

La CD45 (proteína tirosina fosfatasa, tipo de receptor, C; PTPRC) molécula de la superficie celular es expresada específicamente en células hematopoyéticas. La CD45 es una proteína tirosina fosfatasa (PTP) con un

dominio extracelular, un segmento transmembrana individual y dos dominios catalíticos intracitoplásmicos en tándem y de esta manera pertenece a la PTP de tipo receptor. Los estudios sugieren que es un regulador esencial de la señalización de receptores de antígenos de células T y células B que funciona por medio de la interacción directa con componentes de los complejos de receptores de antígenos, o por medio de la activación de varias cinasas de la familia de Src requeridas para la señalización de receptores de antígenos. La CD45 también suprime las JAK cinasas, y de esta manera funciona como un regulador de la señalización de receptores de citocina. La familia de CD45 consiste de múltiples miembros que son todos productos de un gen complejo individual. Varias isoformas conocidas de CD45 incluyen: CD45RA, CD45RB, CD45RC, CD45RAB, CD45RAC, CD45RBC, CD45RO y CD45R (ABC). Se pueden encontrar diferentes isoformas en diferentes células. Por ejemplo, la CD45RA se encuentra en células T cándidas y la CD45RO se encuentra en células T con memoria.

La CD56 (molécula de adhesión de células neurales, NCAM) es una glicoproteína de unión homófila expresada sobre la superficie de neuronas, glía, músculo esquelético y células asesinas naturales. Se cree generalmente que la NCAM tiene un papel en la adhesión de célula-célula, excrecencia neurítica y plasticidad

sináptica. Existen tres isoformas principales conocidas de NCAM, cada una que varía solo en sus dominios citoplásmicos: NCAM-120kDa (anclado a glicosilfosfaridilinositol (GPI)); NCAM-140kDa (dominio citoplásmico corto); y NCAM (dominio citoplásmico largo). Los diferentes dominios de NCAM tienen diferentes papeles, en donde los dominios de Ig están involucrados en la unión homófila a NCAM y los dominios de fibronectina tipo III (FNIII) están involucrados en la señalización que conduce a la excrecencia neurítica.

La CD59 se refiere a una glicoproteína de membrana unida a glicosilfosfatidilinositol (GPI) la cual protege las células humanas de la lisis mediada por el complemento.

La familia de antígenos de CD66 identifica un epítopo específico para neutrófilos dentro del sistema hematopoyético que es expresado por miembros de la familia de antígenos carcinoembriónicos de moléculas de adhesión, las cuales pertenecen a la superfamilia de genes de inmunoglobulina. Las porciones extracelulares de todas las moléculas de CD66 (a-f) poseen un dominio de IgSF conjunto-V N-terminal el cual carece del disulfuro inter-láminas b canónico de la familia de CD-2. La CD66a es una glicoproteína tipo 1 sumamente glicosilada con más de 60% de la masa contribuida por glicanos N-unidos, los cuales

llevan estructuras Lex (sLex, CD15s) sialiladas. En la CD66a están separadas adicionalmente, VxYxxLx21IxYxxV, y parecen configuraciones las cuales se unen a tirosina fosfatasas tales como SHIP-1 y -2. La activación de neutrófilos conduce a la fosforilación de residuos de tirosina en el dominio citoplasmático de CD66a. La CD66a es expresada en granulocitos y células epiteliales. Los productos de 4 de los 7 genes de la familia de antígenos carcinoembriónicos (CEA) funcionales, CD66a-d, se sabe que son expresados en células hematopoyéticas. La expresión de esas moléculas en células hematopoyéticas se restringe generalmente al linaje mieloide. Esas moléculas están presentes en bajos niveles en granulocitos maduros en reposo pero la expresión incrementa rápidamente después de la activación con agonistas inflamatorios, probablemente como resultado de la exocitosis de gránulos de almacenamiento. La CD66a se detecta en algunos macrófagos en secciones de tejido y ha sido reportada en células T y una subpoblación de células NK activadas.

La CD66b ((CGM1); CD67, CGM6, NCA-95) es una proteína unida a glicosilfosfatidilinositol (GPI) que es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulina y la subfamilia similar al antígeno carcinoembriónico (CEA). Se cree generalmente que la CD66b, expresada en granulocitos, está involucrada en la regulación de la adhesión y la

activación de eosinófilos de humano.

La CD90 o Thy-1 es una proteína de la superficie celular conservada anclada al glicofosfatidilinositol (GPI) sumamente N-glicosilada de 25-37 kDa con un dominio de inmunoglobulina similar a V individual, descubierta originalmente como un antígeno de timocito. Pertenece a la superfamilia de genes de inmunoglobulina. Las cadenas laterales de carbohidratos complejas varían en su composición entre tejidos y especies. Generalmente, la CD90 es expresada en células madre hematopoyéticas y neuronas. La CD90 es expresada elevadamente en tejido conectivo, en varias líneas de fibroblastos y células estromales y es expresada en todos los timocitos y células T periféricas en ratones. En humanos, la CD90 es expresada únicamente en una variedad pequeña de timocitos fetales, 10%-40% de células CD34+ sanguíneas en la médula ósea y <1% de linfocitos CD3+CD4+ en la circulación periférica. La CD90 también es expresada en el endotelio de HEV de nódulos linfáticos de humano pero no en otros endotelios y finalmente, es expresada en una variedad limitada de líneas de células linfoblastoides y leucémicas.

La CD105 (endoglina) es una glicoproteína de la membrana integral homodimérica compuesta de subunidades unidas a disulfuro de 90-95 kDa. En humanos, se expresa en niveles altos en células endoteliales vasculares y en el

sincitiotrofoblasto de placenta terminal. Durante el desarrollo del corazón humano, es expresada en altos niveles en la mesénquima de tejido de almohadillas endocárdicas durante la septación del corazón y la formación de válvulas; subsecuentemente la expresión desciende conforme las válvulas maduran. También es expresada por una población de pre-eritroblastos, células leucémicas de linajes linfoides y mieloides, y fibroblastos estromales de la médula ósea. La endoglina es una proteína secundaria de múltiples complejos de receptores de cinasa de la superfamilia de TGF-β. La superfamilia de TGF-β1 de péptidos relacionados estructuralmente incluye las isoformas de TGF-β, β1, β2, β3 y β5, las activinas y las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs). Los factores similares a TGF-β son un conjunto multifuncional de factores de crecimiento y diferenciación conservados que controlan procesos biológicos tales como la embriogénesis, organogénesis, morfogénesis de tejidos como hueso y cartílago, vasculogénesis, reparación de heridas y angiogénesis, hematopoyesis y regulación inmune. La señalización por ligandos de la superfamilia de TGF-β es mediada por un complejo heteromérico, inducido por ligandos, de alta afinidad que consiste de los receptores de Ser/Thr cinasa relacionados divididos en dos subfamilias, tipo I y tipo II. El receptor tipo II

transfosforila y activa el receptor tipo I en una región rica en Gly/Ser. El receptor tipo I a su vez fosforila y transduce señales a una familia novedosa de objetivos corriente abajo identificados recientemente, denominados Smads. La endoglina se une al factor de crecimiento transformante (TGF) TGF-β1 y β3 por medio de la asociación con el receptor de TGF-β tipo II, interactúa con activina-A, interactúa con la proteína morfogénica ósea (BMP)-7 a través de receptores de activina tipo II, ActRII y ActRIIB, y se une a BMP-2 por medio de la interacción con los receptores de unión a ligandos tipo I ALK3 y ALK6.

El antígeno de CD166 (ALCAM), una glicoproteína de 556 aminoácidos que pertenece a la superfamilia de genes de inmunoglobulina, es codificado por el gen de la molécula de adhesión de leucocitos-células activada (ALCAM) en humanos. Contiene una secuencia de señal secretoria, un dominio extracelular el cual contiene 3 dominios tipo C2 similares a Ig, 2 dominios tipo V similares a Ig y 9 sitios de glicosilación unidos a N potenciales, un dominio de extensión transmembrana hidrófobo y un dominio citoplásmico de 32 aminoácidos sin configuraciones conocidas. El dominio de Ig N-terminal es el sitio de unión para interacciones tanto homófilas como de CD166-CD6. La CD166 es anclada al citoesqueleto de actina a través del dominio citoplásmico pero los receptores involucrados en esta interacción se

desconocen. La CD166 soluble se produce por medio de la escisión proteolítica de dominios extracelulares o por medio del empalme alternativo. Es expresada en células madre mesenquimales y células progenitoras y en células epiteliales tímicas corticales y células epiteliales tímicas medulares, neuronas, células T activadas, células B, monocitos, fibroblastos, endotelio, epitelio, subconjuntos primitivos de células hematopoyéticas que incluyen células madre pluripotentes, blastoquistes y endometrio.

1.4. Factores de Crecimiento

Los factores de crecimiento son moléculas de polipéptidos extracelulares que se unen a un receptor de la superficie celular que activa una vía de señalización intracelular, que conduce a la proliferación, diferenciación u otra respuesta celular. Estas vías estimulan la acumulación de proteínas y otras macromoléculas, y lo realizan tanto al incrementar su velocidad de síntesis como al disminuir su velocidad de degradación. Una vía de señalización intracelular activada por receptores de factores de crecimiento involucra la enzima PI 3-cinasa, la cual agrega un fosfato de ATP a la posición 3 de fosfolípidos de inositol en la membrana plasmática. La activación de PI 3-cinasa conduce a la

activación de varias proteína cinasas, que incluyen la S6 cinasa. La S6 cinasa fosforila la proteína ribosómica S6, que incrementa la capacidad de ribosomas para traducir un subconjunto de ARNms, la mayoría de los cuales codifican componentes ribosómicos, como resultado de lo cual, la síntesis de proteínas incrementa. Cuando el gen que codifica la S6 cinasa es inactivado en ***Drosophila***, los números de células son normales, pero el tamaño de células es anormalmente pequeño y las moscas mutantes son pequeñas. Los factores de crecimiento también activan un factor de inicio de traducción llamado eIF4E, que incrementa además la síntesis de proteínas y el crecimiento de células.

La estimulación de factores de crecimiento también conduce a la producción incrementada de la proteína reguladora de genes Myc, la cual juega una parte en la señalización por mitógenos. La Myc incrementa la transcripción de una variedad de genes que codifican proteínas involucradas en el metabolismo de células y la síntesis macromolecular. De esta manera, estimula tanto el metabolismo de células como el crecimiento de células.

Algunas proteínas de señales extracelulares, que incluyen el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por siglas en inglés), pueden actuar como tanto factores de crecimiento como mitógenos, que estimulan tanto el crecimiento de células como el progreso del ciclo

celular. Este traslapo funcional se logra en parte por traslapos en las vías de señalización intracelulares que controlan estos dos procesos. La proteína de señalización Ras, por ejemplo, es activada tanto por factores de crecimiento como por mitógenos. Ésta puede estimular la vía de PI3-cinasa para promover el crecimiento celular y la vía de MAP-cinasa para activar el progreso del ciclo celular. Similarmente, la Myc estimula tanto el crecimiento celular como el progreso del ciclo celular. Los factores extracelulares que actúan como tanto como factores de crecimiento como mitógenos ayudan a asegurar que las células mantengan su tamaño apropiado conforme proliferan.

Puesto que muchos mitógenos, factores de crecimiento y factores de supervivencia son reguladores positivos del progreso del ciclo celular, crecimiento celular y supervivencia celular, tienden a incrementar el tamaño de órganos y organismos. En algunos tejidos, sin embargo, el tamaño de células y tejidos también es influenciado por proteínas de señales extracelulares inhibitorias que se oponen a los reguladores positivos y por lo cual inhiben el crecimiento de órganos. Las proteínas de señales inhibitorias mejor entendidas son el TGF-β y sus congéneres. El TGF-β inhibe la proliferación de varios tipos de células, ya sea al bloquear el progreso del ciclo celular en G1 o al estimular la apoptosis. El TGF-β

se une a receptores de la superficie celular e inicia una vía de señalización intracelular que conduce a cambios en las actividades de proteínas reguladoras de genes llamadas Smads. Esto da por resultado cambios complejos en la transcripción de genes que codifican reguladores de la división celular y la muerte celular.

La proteína morfogénica ósea (BMP), un miembro de la familia de TGF-β, ayuda a activar la apoptosis que retira el tejido entre los dedos en desarrollo en la pata de un ratón. Al igual que el TGF-β, la BMP estimula cambios en la transcripción de genes que regulan la muerte celular.

Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF)

La familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) tiene actualmente más de una docena de miembros relacionados estructuralmente. El FGF1 también es conocido como FGF ácido; el FGF2 es llamado algunas veces FGF básico (bFGF); y el FGF7 tiene algunas veces el nombre factor de crecimiento de queratinocitos. En los vertebrados se conoce más de una docena de genes de FGF distintos; éstos pueden generar cientos de isoformas de proteínas al variar sus codones de empalme e inicio de ARN en diferentes tejidos. Los FGFs pueden activar un conjunto de tirosina cinasas receptoras llamadas los receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFRs). Las tirosina cinasas

receptoras son proteínas que se extienden a través de la membrana celular. La porción de la proteína que se une al factor paracrino está en el lado extracelular, mientras que una tirosina cinasa inactiva (es decir, una proteína que puede fosforilar otra proteína al dividir el ATP) está en el lado intracelular. Cuando el receptor de FGF se une a un FGF (y solo cuando se une a un FGF), la cinasa inactiva se activa, y fosforila ciertas proteínas dentro de la célula respondedora, activando esas proteínas.

Los FGFs están asociados con varias funciones de desarrollo, que incluyen la angiogénesis (formación de vasos sanguíneos), formación de mesodermo y extensión de axones. Mientras que los FGFs pueden sustituirse frecuentemente por otro, su patrón de expresión les proporciona funciones separadas. El FGF2 es especialmente importante en la angiogénesis, mientras que el FGF8 está involucrado en el desarrollo del mesencéfalo y las extremidades.

Se ha descubierto que los niveles de expresión de factores angiogénicos, tales como VEGF, IGF, PDGF, HGF, FGF, TGFm Angiopoyetina-1 y el factor de células madre (SCF) difieren entre MSCs derivadas de huesos, derivadas de cartílagos y derivadas de tejido adiposo. (Peng y colaboradores, 2008, Stems Cells and Development, 17: 761-774).

Factor de Crecimiento similar a Insulina (IGF-1)

El IGF-1, una hormona similar en la estructura molecular a la insulina, tiene efectos promotores del crecimiento en casi cada célula en el cuerpo, especialmente el músculo esquelético, cartílago, hueso, hígado, riñón, nervios, piel, células hematopoyéticas y pulmones. Éste desempeña un papel importante en el crecimiento de los niños y continúa teniendo efectos anabólicos en los adultos. El IGF-1 es producido principalmente por el hígado como una hormona endócrina así como también en tejidos objetivo en una forma paracrina/autocrina. La producción es estimulada por la hormona de crecimiento (GH) y puede ser retardada por la desnutrición, insensibilidad a la hormona del crecimiento, falta de receptores de la hormona del crecimiento o fallas de las moléculas de señalización corriente abajo, que incluyen SHP2 y STAT5B. Su acción principal es mediada por la unión a su receptor específico, el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1R), que está presente en muchos tipos de células en muchos tejidos. La unión al IGF1R, una tirosina cinasa receptora, inicia la señalización intracelular; el IGF-1 es uno de los activadores naturales más potentes de la vía de señalización de AKT, un estimulador del crecimiento y proliferación de células y un inhibidor potente de la muerte programada de células. El IGF-1 es un mediador

principal de los efectos de la hormona del crecimiento (GH). La hormona del crecimiento se hace en la glándula pituitaria, es liberada en el torrente sanguíneo y luego estimula el hígado para producir el IGF-1. El IGF-1, entonces estimula el crecimiento sistémico del cuerpo. Además de sus efectos similares a la insulina, el IGF-1 también puede regular el crecimiento y desarrollo de células, especialmente en células nerviosas, así como también en la síntesis de ADN celular.

Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF-β)

Existen más de 30 miembros estructuralmente relacionados de la superfamilia de TGF-β, y regulan algunas de las interacciones más importantes en el desarrollo. Las proteínas codificadas por los genes de la superfamilia de TGF-β son procesadas de tal manera que la región carboxi-terminal contiene el péptido maduro. Estos péptidos son dimerizados en homodímeros (con ellos mismos) o heterodímeros (con otros péptidos de TGF-β) y son secretados de la célula. La superfamilia de TGF-β incluye la familia de TGF-β, la familia de activina, las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), la familia de Vg-1 y otras proteínas, incluyendo el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF, necesario para la diferenciación del riñón y neuronas entéricas) y el factor inhibitorio Mulleriano, el

cual está involucrado en la determinación del sexo de mamíferos. Los miembros de la familia de TGF-β TGF-β1, 2, 3 y 5 son importantes en la regulación de la formación de la matriz extracelular entre células y para regular la división celular (tanto de manera positiva como de manera negativa). El TGF-β1 incrementa la cantidad de células epiteliales de la matriz extracelular hechas tanto por medio de la estimulación de la síntesis de colágeno y fibronectina como por medio de la inhibición de la degradación de la matriz. Los TGF-βs pueden ser cruciales en el control donde y cuando los epitelios pueden ramificarse para formar los conductos de riñones, pulmones y glándulas salivales.

Los miembros de la familia de BMP se descubrieron originalmente por su capacidad para inducir la formación de huesos. Sin embargo, la formación de huesos es solo una de sus muchas funciones y se ha descubierto que regulan la división celular, apoptosis (muerte programada de células), migración de células y diferenciación. Las BMPs se pueden distinguir de otros miembros de la superfamilia de TGF-β por tener siete, preferiblemente que nueve, cisteínas conservadas en el polipéptido maduro. Las BMPs incluyen proteínas tales como Nodal (responsable de la formación de ejes izquierdos-derechos) y BMP4 (importante en la polaridad de tubos neurales, desarrollo de ojos y muerte de

células).

Factor de Crecimiento Epidérmico Neural Similar 1 (NELL1)

El factor de crecimiento epidérmico neural similar 1 (NEL-similar 1, NELL1) es un gen que codifica un polipéptido de 810 aminoácidos, el cual se trimeriza para formar una proteína madura involucrada en la regulación del crecimiento y diferenciación de células. El gen del factor de crecimiento epidérmico neural similar (nel) se detectó primero en el tejido neural de una colección de ADNc de pollo embriónico y su NELL1 ortólogo humano se descubrió después en células B. Los estudios han reportado la presencia de NELL en varios órganos fetales y adultos que incluyen, pero no están limitados a, el cerebro, riñones, colon, timo, pulmones e intestino delgado.

Estructura General del NELL1

Generalmente, la ordenación de los dominios funcionales de la proteína de NELL1 de 810 aminoácidos se asemeja a la trombospondina-1 (“THBS1”) y consiste de un dominio N-terminal de trombospondina (“TSPN”) y varios dominios de factor de von Willebrand, tipo C (“VWC”) y del factor de crecimiento epidérmico (“EGF”).

Los estudios adicionales han mostrado que existen

dos variantes de transcripción que codifican diferentes isoformas. La variante de transcripción del precursor de la isoforma 1 del nel-similar 1 representa la transcripción más larga y codifica la isoforma 1 más larga.

Los dominios conservados de la transcripción del receptor de la isoforma 1 del nel-similar 1 residen en siete regiones del péptido de la isoforma 1 e incluyen: (1) un dominio de la superfamilia de G de domaina/Laminina de TSPN; (2) un dominio de VWC; (3) un dominio similar a EGF; (4) un dominio similar a EGF; (5) un dominio similar a EGF; (6) un dominio similar a EGF y (7) un dominio de VWC.

La primera región de dominio conservada comprende aminoácidos (los aminoácidos de 29 a 213) que son más similares a un dominio similar a N-terminal de trombospondina. Las trombospondinas son una familia de glicoproteínas adhesivas, relacionadas, las cuales son sintetizadas, secretadas e incorporadas en la matriz extracelular de una variedad de células, que incluyen los gránulos alfa de plaquetas después de la activación de trombina y células endoteliales. Éstas interactúan con una variedad de factores de coagulación y factores anticoagulantes de la sangre, y están involucradas en la adhesión de células, agregación de plaquetas, proliferación de células, angiogénesis, metástasis de tumores, crecimiento de músculo liso vascular y reparación de

tejidos. El primer dominio conservado también comprende aminoácidos (los aminoácidos 82 a 206; los aminoácidos 98 a 209) que son similares a un dominio similar a Laminina G. Los dominios similares a Laminina G (LamG) son usualmente receptores mediados por Ca^{2+} que pueden tener sitios de unión para esteroides, β1-integrinas, heparina, sulfátidos, fibulina-1 y α-distroglicanos. Las proteínas que contienen dominios de LamG sirven para una variedad de propósitos, que incluyen la transducción de señales a través de receptores esteroides de la superficie celular, adhesión, migración y diferenciación a través de la mediación de moléculas de adhesión celular.

Mucho de lo que se sabe acerca de NELL1 tiene que ver con su papel en el desarrollo de los huesos. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 7,884,066, la Patente de los Estados Unidos No. 7,833,968, la Patente de los Estados Unidos No. 7,807,787, la Patente de los Estados Unidos No. 7,776,361, la Patente de los Estados Unidos No. 7,691,607, la Patente de los Estados Unidos No. 7,687,462, la Patente de los Estados Unidos No. 7,544,486 y la Patente de los Estados Unidos No. 7,052,856, el contenido completo de las cuales se incorpora en este documento a manera de referencia. Se cree generalmente que durante la diferenciación osteogénica, la señalización de NELL1 puede involucrar una molécula relacionada con integrina y

tirosina cinasas que son activadas por NELL1 que se une a un receptor específico para NELL1 y una formación subsecuente de un complejo extracelular. Como se entiende de esta manera hasta ahora, en el NELL1 de humano (hNELL1), el dominio de laminina G comprende aproximadamente 128 residuos de aminoácidos que muestran un alto grado de similitud con el dominio de laminina G de proteínas de la matriz extracelular ("ECM"), tal como la cadena de laminina α3 de humano (hLAMA3), la cadena de laminina α3 de ratón (mLAMA3), la cadena de colágeno 11 α3 de humano (hCOLA1) y la trombospondina-1 de humano (hTSP1). Este complejo facilita ya sea la activación de Tyr-cinasas, la inactivación de Tyr fosfatasas o el reclutamiento intracelular de proteínas fosforiladas con Tyr. La integrina unida a un ligando (receptores de la superficie celular que interactúan con proteínas de ECM tales como, por ejemplo, laminina 5, fibronectina, vitronectina, TSP1/2) transduce las señales a través de la activación de la cinasa de adhesión focal (FAK, por sus siglas en inglés) seguida por la activación indirecta de la cascada de Ras-MAPK, y luego conduce a la diferenciación osteogénica a través de Runx2; se cree que el dominio de laminina G desempeña un papel en la interacción entre integrinas y un receptor de laminina de 67 kDa.

El segundo dominio conservado (los aminoácidos

273 a 331) y el séptimo dominio conservado (los aminoácidos 701 a 749; los aminoácidos 703 a 749) son similares a los dominios del factor de von Willebrand tipo C (VWC), también conocidos como repeticiones similares a cordina. Los dominios de VWC ocurren en numerosas proteínas de funciones diversas. Se piensa que esos dominios pueden estar involucrados en la oligomerización de proteínas.

El tercer dominio conservado (aminoácidos 434 a 471; aminoácidos 434 a 466), el cuarto dominio conservado (aminoácidos 478 a 512), el quinto dominio conservado (aminoácidos 549 a 586; aminoácidos 549 a 582) y el sexto dominio conservado (aminoácidos 596 a 627; aminoácidos 596 a 634) son similares al dominio similar a EGF que se une al calcio. Los dominios similares a EGF que se unen al calcio están presentes en un gran número de proteínas unidas a la membrana y extracelulares (principalmente de origen animal). Muchas de estas proteínas requieren calcio para su función biológica. Se ha descubierto que los sitios de unión al calcio están localizados en la N-terminal de dominios similares a EGF particulares, lo que sugiere que la unión al calcio puede ser crucial para numerosas interacciones de proteína-proteína. Seis cisteínas de núcleo conservadas forman tres conexiones de disulfuro como en dominios de EGF que no se unen al calcio cuyas estructuras son muy similares.

La variante de transcripción del precursor de la isoforma 2 de nel-similar 1 carece de un exón sin cambio de pauta de lectura alternativo en comparación con la variante 1. La isoforma 2 resultante, la cual tiene las mismas terminaciones -N y -C que la isoforma 1 pero es más corta en comparación con la isoforma 1, tiene seis regiones conservadas que incluyen un dominio de TSPN/dominio de la superfamilia de LamG (aminoácidos 29 a 313); dominios de VWC (aminoácidos 273 a 331; aminoácidos 654 a 702); y dominios similares a EGF que se unen al calcio (aminoácidos 478 a 512; aminoácidos 434 a 471; aminoácidos 549 a 580).

El NELL1 y sus ortólogos se encuentran a través de varias especies que incluyen Homo sapiens (hombre), Mus musculus (ratón), Rattus norvegicus (rata), Pan troglodytes (chimpancé), Xenopus (Silurana) tropicalis (rana), Canis lupus familiaris (perro), Culex quinquefasciatus (mosquito) Pediculus humanus corporis (piojo de la cabeza), Aedes aegypti (mosquito), Ixodes scapularis (garrapata), Strongylocentrotus purpuratus (erizo de mar púrpura) y Acyrthosiphon pisum (pulgón verde del chícharo).

El NELL1 es Variable

El NELL1 comprende varias regiones susceptibles a la recombinación incrementada. Los estudios han indicado que las susceptibilidades a ciertas enfermedades se pueden

asociar con variaciones genéticas dentro de esas regiones, lo que sugiere la existencia de más de una variante causal en el gen de NELL1. Por ejemplo, en pacientes que sufren de síndrome de intestino irritable ("IBS"), seis polimorfismos de nucleótidos individuales diferentes (SNPs) dentro del NELL1 han sido identificados, con la mayoría de estos SNPs cerca del extremo 5' del gen y algunos en el extremo 3'. Estos incluyen R136S y A153T (los cuales residen en TSPN) y R354W (el cual reside en un dominio de VWC). Los estudios adicionales han identificado por lo menos 26 variantes que comprenden algunas de por lo menos 263 SNPs dentro de la región de NELL1.

Función de NELL1

La proteína de NELL1 es una proteína heterotrimérica citoplasmática secretada. El papel completo que el NELL1 desempeña in vivo permanece siendo desconocido.

Varios estudios han indicado que el NELL1 puede desempeñar un papel en la formación de huesos, enfermedad de intestino inflamatorio y adenocarcinoma esofágico, entre otros.

El NELL1 en la Osteogénesis

Se cree generalmente que el NELL1 induce la diferenciación osteogénica y la formación de huesos de

células osteoblásticas durante el desarrollo. Los estudios han mostrado que la proteína de NELL1 (1) activa de manera transitoria la cascada de señalización de proteína cinasa activada por mitógenos ("MAPK") (la cual está involucrada en varias actividades celulares tales como la expresión de genes, mitosis, diferenciación, proliferación y apoptosis); y (2) induce la fosforilación de Runx2 (un factor de transcripción asociado con la diferenciación de osteoblastos). Consecuentemente, se cree generalmente que con la unión a un receptor específico, el NELL1 transduce una señal osteogénica a través de la activación de ciertas Tyr-cinasas asociadas con la cascada de Ras-MAPK, lo cual conduce finalmente a la diferenciación osteogénica. Los estudios han mostrado que el desarrollo de huesos se altera gravemente en ratones transgénicos donde la sobreexpresión de NELL1 se ha mostrado que conduce a la craniosinostosis (osificación prematura del cráneo y cierre de las suturas) y la deficiencia de NELL1 se manifiesta en defectos esqueléticos debido a la condrogénesis y osteogénesis reducidas.

Los estudios adicionales han apoyado un papel para el NELL-1 como un gen relacionado con la craneosinostosis. Por ejemplo, se han identificado tres regiones dentro del promotor de NELL-1 que se unen directamente y son transactivados por Runx2. Además, los

estudios en bóvedas craneales de ratas han indicado que la expresión forzada de Runx2 induce la expresión de NELL-1 (lo cual sugiere que el Nell-1 es un objetivo corriente abajo de Runx2).

2. Células del Compartimiento de Tejido Conectivo

El compartimento de tejido conectivo contiene células que funcionan principalmente para elaborar y mantener la estructura de ECM. El carácter de la matriz extracelular es específica para la región y es determinado por la cantidad de los materiales extracelulares.

Los tipos comunes de células de los compartimentos de tejido conectivo incluyen: fibroblastos, macrófagos, mastocitos y células plasmáticas. Los compartimentos de tejido conectivo especializados, tales como cartílago, hueso y la vasculatura, y aquellos con propiedades especiales, tales como tejido adiposo, tendones, ligamentos, etcétera, tienen células especializadas para realizar funciones especializadas.

2.1. Compartimiento de Tejido Adiposo

Los compartimentos de tejido adiposo son compartimentos de tejido conectivo dinámicos, multifuncionales, ubicuos y sueltos. El tejido adiposo comprende fibroblastos, células de músculo liso, células

endoteliales, leucocitos, macrófagos y células grasas rellenas de lípidos maduras empacadas estrechamente, denominadas adipocitos, con núcleos característicos empujados hacia un lado, incorporados dentro de una matriz aureolar que están localizados en capas subcutáneas de la piel y músculo (paniculus adiposus), en la región de los riñones, córnea, mamas, mesenterios, mediastino, y en las regiones cervical, axilar e inguinal. Los adipocitos desempeñan un papel principal en el almacenamiento de energía y en la provisión de aislamiento y protección. Como los sitios de almacenamiento de energía, los adipocitos regulan la acumulación y movilización de triacilglicerol en respuesta a los requerimientos de energía del cuerpo y almacenan energía en la forma de una gota de grasa individual de triglicéridos, incluidos entre la clase más general de lípidos.

Matriz de Adipocitos

Cada adipocito está rodeado por una ECM gruesa llamada la lámina basal. El andamio de ECM de adipocitos fuerte disminuye la tensión mecánica al esparcir fuerzas sobre un área superficial grande de los compartimentos de tejidos adiposos. La composición de ECM de los adipocitos es similar a aquella de otros tipos de células, pero es la cantidad relativa de componentes individuales lo cual

confiere especificidad hacia células. La ECM de adipocitos está enriquecida particularmente en colágeno VI, una superhélice que comprende las subunidades α1(VI), α2(VI) y α3(VI). El colágeno VI se une al colágeno IV y también otras proteínas de matriz tales como proteoglicanos y fibronectina. La Tabla 5 lista proteínas de núcleo que han sido anotadas a la ECM de adipocitos con técnicas proteómicas actuales. (Mariman y colaboradores, 2010, ***Cell. Mol. Life Sci.,*** 67: 1277-1292).

Tabla 5: Proteínas de Núcleo de ECM de Adipocitos Humanos

Proteína	Símbolo
Proteína de núcleo de proteoglicano de heparán sulfato específica para la membrana basal (HSPG) (perlecan)	HSPG2
Calrreticulina	CALR
Proteína 1 similar a quitinasa-3	CHl3l1
Dominio de superhélice que contiene proteína 80	CCDC80
Cadena de colágeno α 1(I)	COL1A1
Cadena de colágeno α 2(I)	COL1A2
Cadena de colágeno α 1(III)	COL2A1
Cadena de colágeno α 2(IV)	COL4A2
Cadena de colágeno α 1(V)	COL5A1
Cadena de colágeno α 1(VI)	COL6A1
Cadena de colágeno α 2(VI)	COL6A2
Cadena de colágeno α 3(VI)	COL6A3

Proteína	Símbolo
Cadena de colágeno α 1(XII)	COL12A1
Cadena de colágeno α 1(XIV) (undulina)	COL14A1
Cadena de colágeno α 1(XV)	COL15A1
Cadena de colágeno α 1 (XVIII)	COL18A1
Decorina (proteoglicano óseo II)	DCN
Dermatopontina (proteína de matriz ácida rica en tirosina; proteína quiescente temprana 1)	DPT
Proteína localizada en la zona interfacial de microfibrillas de elastina 1	EMILIN1
Fibronectina (FN) (globulina insoluble en frío)	FN1
Fibulina-1	FBLN1
Fibulina-3 (proteína de matriz extracelular similar a fibulina que contiene EGF 1)	FBLN3
Fibulina-5 (proteína similar a EGF de arterias y cresta neural para el desarrollo	FBLN5
Galectina-1	LGALS1
Proteína de unión a galectina-3 (proteína de unión-3 soluble de unión a lectina galactosida)	LGALS3BP
Glipican 1	GPC1
Cadena de laminina α-4	LAMA4
Cadena de laminina β-1	LAMB1
Cadena de laminina β-2	LAMB2
Cadena de laminina γ-1	LAMC1
Lumican (lumican de proteoglicano de queratán sulfato)	LUM
Matrilina-2	MATN2

Proteína	Símbolo
Glicoproteína asociada con microfibrillas 4	MFAP4
Mimecan (osteoglicina)	OGN
Nidogen 1 (entactina)	NID1
Nidogen 2 (osteonidógeno)	NID2
Periostina	POSTN
Proteoglicano 4	PRG4
SPARC (osteonectina)	SPARC
Espondina-1 (F-espondina) (factor promotor del crecimiento de células de músculo liso vascular)	SPON1
Espondina-2 (mindina)	SPON2
Tenascina-C (TN) (hexabraquión) (citotactina) (neuronectina) (GMEM)	TNC
Tenascina-X	TNXB
Tromboespondina-1	THBS1
Trombosepondina-2	THBS2
Proteína inducida por el factor-b de crecimiento transformante IG-H3 (bIG-H3)	TGFB1
Proteína de núcleo de versican (proteoglicano de fibroblastos grandes)	CSPG2
Isoforma V3 de versican	VCAN

La ECM de adipocitos experimenta el desarrollo bifásico durante la adipogénesis, el proceso de formación de compartimentos de tejido adiposo maduros. Existe una disminución inicial en el colágeno I y III, mientras que sus niveles regresan a un estado de pre-diferenciación en etapas

posteriores. La ECM de adipocitos madura se mantiene en un estado dinámico con renovación constante de componentes de ECM por un balance de actividades de enzimas constructivas de ECM y enzimas de degradación de ECM. En etapas tempranas de diferenciación, el balance se cambia hacia los factores constructivos. (Mariman y colaboradores, 2010, ***Cell. Mol. Life Sci.,*** 67: 1277-1292). La maduración de componentes de ECM recientemente sintetizados se inicia en el lumen de ER donde las proteínas de ECM experimentan modificaciones bioquímicas y el procesamiento proteolítico antes del ensamble. Para el colágeno, estas modificaciones incluyen la hidroxilación y glicosilación de prolina y lisina y la sujeción de péptidos N- y C-terminales por procolágeno N- y C-colagenasa respectiva. Las proteínas procesadas entonces son ensambladas y secretadas en el ambiente extracelular donde experimentan un procesamiento adicional por enzimas de modificación y procesamiento extracelular secretadas. Conforme los preadipocitos se diferencian y comienzan a almacenar sustancias grasas, que incluyen lípidos, la ECM asume una estructura laminar basal.

Células Madre derivadas de Tejido Adiposo

El tejido adiposo también comprende una población de células madre pluripotentes que tienen el potencial para dar origen a células de los tres linajes embriónicos:

ectodérmico, mesodérmico y endodérmico. La adipogénesis, la cual comprende los pasos que consisten en la diferenciación de estas células pluripotentes a adipocitos maduros, se inicia por medio de la diferenciación de estas células pluripotentes para dar origen a una población de células precursoras mesenquimales o células madre mesenquimales (MSCs), las cuales tienen el potencial de diferenciarse en una variedad de linajes de células mesodérmicas tales como por ejemplo, mioblastos, condroblastos, osteoblastos y adipocitos. En presencia de señales ambientales y de expresión de genes apropiadas, las MSCs pasan por la detención del crecimiento y se diferencian en precursores con un destino determinado que experimenta la expansión clonal, se comprometen y se diferencian terminalmente para dar origen a células maduras. La población de MSCs y progenitores adiposos más comprometidos que se encuentran junto con el estroma de tejido adiposo se denominan colectivamente células madre derivadas de tejido adiposo (ASCs). Estas células tienen un fenotipo de la superficie $CD45^{-}CD31^{-}CD34^{+}CD105^{+}$ característico. En el caso de la diferenciación de adipocitos, las ASCs se diferencian en proadipocitos que experimentan la diferenciación final para dar origen a adipocitos maduros. Las células progenitoras mesenquimales con potencial condrogénico también han sido identificadas en la almohadilla adiposa infrarrotuliana en las articulaciones

(Lee y colaboradores, Tissue Engg. 2010, 16(1): 317-325).

La Tabla 6 lista linajes de células y factores inductivos respectivos que se pueden derivar de líneas de ASC. (Brown *y colaboradores* 2010, Plast. Reconstr. Surg., 126(6): 1936-1946; Gregoire y colaboradores, 1998, Physiol. Rev. 78(3): 783-809).

Tabla 6. Factores Inductivos y Linajes Celulares de Células Madre derivadas de Tejido Adiposo

Linaje de Células	Factores Inductivos
Adipocito	Dexametasona; isobutil-metilxantina; indoxantina; insulina; tiazolidindiona; glucocorticoides de hormona nuclear, por ejemplo, 3,3',5-triyodotironina (T_3) y ácido retinoico (RA); IGF-1; PGE_2
Cardiomiocito	Transferrina; IL-3; IL-6; VEGF
Condrocito	Ácido ascórbico; proteína morfogénica ósea 6; dexametasona; insulina; factor de crecimiento transformante-β (TGF-β)
Endotelial	Medio de EGM-2-MV (Cambrex, Walkersville, MD) que contiene ascorbato, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de fibroblastos básico e hidrocortisona
Miocito	Dexametasona suero de caballo
Similar a neurona	Hidroxianisol butilado; ácido valproico; insulina
Osteoblasto	Ácido ascórbico, proteína morfogenética ósea-2; dexametasona; 1,25-dihidroxivitamina D

Factores Secretados por Tejido Adiposo

El tejido adiposo se considera un órgano secretorio. El secretoma adiposo no solo incluye factores estructurales y solubles que contribuyen a la formación de la matriz adiposa, sino también una multitud de factores solubles con función endocrina, tales como factores de crecimiento, hormonas, quimiocinas y lípidos, denominados colectivamente adipocinas. Las adipocinas ejemplares incluyen, sin limitación, leptina, adiponectina, resistina, interleucina 6 (IL-6), proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α); factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Las adipocinas inmunológicas ejemplares, involucradas particularmente en vías inflamatorias incluyen, sin limitación, amiloide seroso A3 (SAA3), IL-6, adiponectina, TNF-α y haptoglobina. Las adipocinas ejemplares involucradas en la producción de nuevos vasos sanguíneos incluyen, sin limitación, angiopoyetina-1, angiopoyetina-2, VEGF, factor de crecimiento transformante beta (TGF-β), factor de crecimiento hepático (HGF), factor de crecimiento derivado del estroma 1 (SDF-1), TNF-α, resistina, leptina, factor tisular, factor de crecimiento placentario (PGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) y monobutirina.

La adiponectina, un factor metabólico clave

secretado de adipocitos, es una proteína de 30 kDa que puede existir como un trímero, hexámeros de bajo peso molecular u octadecámeros de alto peso molecular. La adiponectina circula por todo el plasma y tiene una variedad de efectos metabólicos que incluyen, pero no están limitados a, disminución de glucosa y estimulación de cardioprotección de la proliferación de músculo liso. La adiponectina ha sido implicada en una variedad de condiciones patológicas que incluyen, pero no están limitadas a diabetes, obesidad, síndrome metabólico, enfermedad cardiovascular y curación de heridas.

La resistina, un miembro de la familia de hormonas similares a resistina (RELM), es secretada por células vasculares estromales del tejido adiposo. La resistina es secretada en dos isoformas multiméricas y funciona para contrabalancear los efectos de sensibilización a la insulina de la adiponectina. (Truillo, M.E. y Scherer P.E., Endocrine Rev. 2006, 27(7): 762-778).

Las secreciones de adipocitos residentes, macrófagos y ASCs contribuyen colectivamente al secretoma adiposo. La Tabla 7 proporciona un perfil de adipocina reportado de ASCs. (Kilroy ***y colaboradores***, 2007, J. Cell. Physiol. 212: 702-709).

Tabla 7. Perfil Reportado de Adipocina de las ASCs de Humano

Función	Adipocina
Angiogénico	HGF
	VEGF
Hematopoyética	ligando de Flt-3
	G-CSF
	GM-CSF
	IL-7
	IL-12
	M-CSF
	SCF
Proinflamatoria	IL-1 alfa
	IL-6
	IL-8
	IL-11
	LIF
	TNF-alfa

Factores de Transcripción Responsables para la Adipogénesis

La diferenciación de adipocitos implica la comunicación cruzada entre señales externas en el ambiente de ECM con señales internas generadas desde el núcleo. Los receptores activados por proliferadores de peroxisoma

(PPAR) y la familia de proteínas de unión a intensificadores de CCAAT (C/EBP) de factores de transcripción desempeñan un papel importante en la adipogénesis. Los PPARs, miembros de la familia de receptores de hormonas nucleares tipo II, forman heterodímeros con el receptor de retinoide X (RXR). Éstos regulan la transcripción por medio de la unión de heteridímeros de PPAR-RXR a un elemento de respuesta caracterizado por una repetición directa de la configuración de reconocimiento de ADN hexamérico receptor nuclear, PuGG-TCA. El PPAR-γ es el más específico para el tejido adiposo de todos los PPARs y es activado antes de la regulación por incremento transcripcional de la mayoría de otros genes de adipocitos. La familia de C/EBP de factores de transcripción también es inducida antes de la activación de otros genes de adipocitos y desempeña un papel principal en la diferenciación de adipocitos. Los miembros de la familia de hélice-bucle-hélice básica (bHLH) de factores de transcripción también han sido implicados en la adipogénesis. (Gregoire y colaboradores, 1998, Physiol. Rev. 78(3): 783-809).

2.2. Compartimiento de Tejido de Hueso (Óseo)

El tejido óseo es una forma rígida de tejido conectivo organizado normalmente dentro de estructuras

definidas, los huesos. Éstas forman el esqueleto, sirven para la unión y protección de las partes blandas y, por su unión a los músculos, actúan como palancas que producen el movimiento del cuerpo. Un hueso también es un lugar de almacenamiento para calcio que puede ser retirado cuando sea necesario para mantener un nivel normal de calcio en la sangre.

Los huesos se pueden clasificar de acuerdo con su forma. Los ejemplos de tipos de hueso incluyen: huesos largos cuya longitud es mayor que su anchura (por ejemplo, fémur (hueso del muslo), húmero (hueso largo de la extremidad superior), tibia (hueso de la espinilla), fíbula (peroné), radio (el hueso exterior de los dos huesos del antebrazo) y ulna (el hueso interior de los dos huesos del antebrazo)), huesos cortos cuya longitud y anchura es aproximadamente igual (por ejemplo, huesos carpianos (huesos del puño en la mano)), huesos planos (por ejemplo, cráneo (huesos del cráneo que rodean el cerebro), escápula (paleta del hombro) e ilions (el hueso más hacia arriba y más grande de la pelvis)), huesos irregulares (por ejemplo, vértebras) y huesos sesamoides, huesos pequeños presentes en las articulaciones para proteger tendones (tejidos conectivos fibrosos que conectan músculos a los huesos, por ejemplo, huesos de rótula (protector de la rodilla)).

Aproximadamente, se pueden distinguir dos tipos

de hueso: hueso poroso, trabecular o esponjoso y hueso cortical, compacto o denso.

El hueso cortical, también referido como hueso compacto o hueso denso, es el tejido de la capa exterior dura de los huesos, comúnmente llamado debido a sus aberturas y espacios mínimos. Este tejido proporciona a los huesos su apariencia lisa, blanca y sólida. El hueso cortical consiste de sitios de Havers (los canales a través de los cuales los vasos sanguíneos y el tejido conectivo pasan en el hueso) y osteones (las unidades básicas de estructura del hueso cortical que comprenden un canal de Havers y sus laminillas dispuestas concéntricamente), de modo que en el hueso cortical, el hueso rodea el suministro de sangre. El hueso cortical tiene una porosidad de aproximadamente 5% a aproximadamente 30%, y representa aproximadamente 80% de la masa ósea total de un esqueleto adulto.

Hueso Poroso (Hueso Trabecular o Esponjoso)

El tejido de hueso poroso, una red de poros celulares, abierta también llamada hueso trabecular o esponjoso, llena el interior del hueso y está compuesto de una red de elementos similares a varillas y placas que hacen que la estructura total sea más ligera y permiten espacio para los vasos sanguíneos y la médula ósea de modo

que el suministro de sangre rodea al hueso. El hueso poroso representa el 20% restante de la masa ósea total pero tiene casi diez veces el área superficial del hueso cortical. No contiene sitios de Havers y osteones y tiene una porosidad de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%.

La cabeza de un hueso, denominada la epífisis, tiene una apariencia esponjoso y consiste de trabéculas de hueso irregulares delgadas, o barras, las cuales experimentan la anastomosis para formar un enrejado, los intersticios del cual contienen la médula, mientras que la vaina exterior delgada aparece densa. Los espacios medulares irregulares de la epífisis se vuelven continuos con la cavidad medular central del eje del hueso, denominada la diáfisis, cuya pared está formada por una placa delgada de hueso cortical.

Tanto el hueso poroso como el hueso cortical tienen los mismos tipos de células y sustancia intercelular, pero difieren entre sí en la ordenación de sus componentes y en la relación de espacio medular con respecto a sustancia de hueso. En el hueso poroso, los espacios medulares son relativamente grandes y están dispuestos irregularmente, y la sustancia de hueso está en la forma de trabéculas de anastomosis delgadas y espículos picudos. En el hueso cortical, los espacios o canales son angostos y la sustancia de hueso se empaca densamente.

Con muy pocas excepciones, las formas cortical y porosa están presentes ambas en cada hueso, pero la cantidad y distribución de cada tipo varía considerablemente. Las diáfisis de los huesos largos consisten principalmente de tejido cortical; solo la capa más hacia el interior que rodea inmediatamente la cavidad medular es hueso poroso. Los huesos tabulares de la cabeza están compuestos de dos placas de hueso cortical que encierra el espacio medular conectado por barras irregulares de hueso poroso. Las epífisis de los huesos largos y la mayoría de los huesos cortos consisten de hueso poroso cubierto por una vaina exterior delgada de hueso cortical.

Cada hueso, excepto en su extremo articular, está rodeado por un recubrimiento fibroblástico vascular, el periostio. El comúnmente llamado endostio, o periostio interior de la cavidad medular y espacios medulares, no es una capa bien delimitada; consiste de una concentración variable de tejido conectivo medularmente reticular que contiene células osteogénicas que están en contacto inmediato con el tejido de hueso.

Componentes de Hueso

El hueso está compuesto de células y una matriz intercelular de sustancias orgánicas e inorgánicas.

La fracción orgánica consiste de colágeno,

glicosaminoglicanos, proteoglicanos y glicoproteínas. La matriz de proteínas del hueso está compuesta en gran medida de colágeno, una familia de proteínas fibrosas que tienen la capacidad de formar fibras insolubles y rígidas. El colágeno principal en el hueso es el colágeno tipo I.

El componente inorgánico del hueso, el cual es responsable de su rigidez y puede constituir hasta dos terceras partes de su peso en seco libre de grasa, está compuesto principalmente de fosfato de calcio y carbonato de calcio, en la forma de hidroxiapatita de calcio, con pequeñas cantidades de hidróxido de magnesio, fluoruro y sulfato. La composición varía con la edad y con una variedad de factores dietéticos. Los minerales del hueso forman grandes cristales finos que agregan resistencia y rigidez a las fibras de colágeno; el proceso por medio del cual se establece se denomina mineralización.

Células de Huesos

Cuatro tipos de células en el hueso están involucradas en su formación y mantenimiento. Éstas son: 1) células osteoprogenitoras, 2) osteoblastos, 3) osteocitos y 4) osteoclastos.

Células Osteoprogenitoras

Las células osteoprogenitoras surgen de células

mesenquimales y ocurren en la porción interior del periostio y en el endostio de hueso maduro. Éstas se encuentran en regiones del compartimento mesenquimal embriónico donde está comenzando la formación del hueso y en áreas cerca de las superficies de huesos en crecimiento. Estructuralmente, las células osteoprogenitoras difieren de las células mesenquimales de las cuales han surgido. Éstas son células de forma irregular y alargadas que tienen un citoplasma de tinción pálida y núcleos de tinción pálida. La células osteoprogenitoras, las cuales se multiplican por medio de la mitosis, son identificas principalmente por su ubicación y por su asociación con osteoblastos. Algunas células osteoprogenitoras se diferencian en osteocitos. Mientras que los osteoblastos y los osteocitos ya no son mitóticos, se ha mostrado que una población de células osteoprogenitoras persiste toda la vida.

Osteoblastos

Los osteoblastos, los cuales están localizados sobre la superficie de costuras osteoides (la región medular sobre la superficie de un hueso de una matriz orgánica recientemente formada todavía no mineralizada), se derivan de células osteoprogenitoras. Éstas son células formadoras de hueso, mononucleadas, inmaduras que sintetizan colágeno y controlan la mineralización. Los osteoblastos se pueden

distinguir de las células osteoprogenitoras de manera morfológica; éstos son generalmente más grandes que las células osteoprogenitoras y tienen un núcleo más redondeado, un núcleo más prominente, y el citoplasma que es mucho más basófilo. Los osteoblastos hacen una mezcla de proteínas conocida como osteoide, compuesta principalmente de colágeno tipo I, el cual se mineraliza para convertirse en hueso. Los osteoblastos también fabrican hormonas, tales como prostaglandinas, fosfatasa alcalina, una enzima que tiene un papel en la mineralización del hueso, y proteína de matriz.

Osteocitos

Los osteocitos, células de hueso maduras en forma de estrella derivadas de osteoblastos y la célula más abundante encontrada en el hueso compacto, mantienen la estructura del hueso. Los osteocitos, como los osteoblastos, no tienen la capacidad de la división mitótica. Éstos están involucrados activamente en la renovación rutinaria de la matriz ósea y residen en espacios pequeños, cavidades, aberturas o depresiones en la matriz ósea llamada laguna. Los osteocitos mantienen la matriz ósea, regulan la homeostasis de calcio y se piensa que son parte del mecanismo de retroalimentación celular que dirige el hueso para formarse en lugares donde es más necesario. El hueso se adapta a fuerzas aplicadas al crecer

más fuerte con el propósito de resistirlas; los osteocitos pueden detectar la deformación mecánica y pueden mediar la formación de hueso por medio de osteoblastos.

Osteoclastos

Los osteoclastos, los cuales se derivan de un linaje de células madre de monocitos y procesan mecanismos de tipo fagocíticos similares a macrófagos, se encuentran frecuentemente en depresiones en el hueso referida como lagunas de Howship. Éstos son células multinucleadas grandes que están especializadas en la resorción del hueso. Durante la resorción, los osteoclastos sellan completamente un área de la superficie del hueso; luego, cuando son activados, bombean iones de hidrógeno para producir un ambiente muy ácido, el cual disuelve el componente de hidroxiapatita. El número y la actividad de los osteoclastos incrementa cuando la reabsorción de calcio es estimulada por la inyección de la hormona parasitoide (PTH), mientras que la actividad osteoclástica es suprimida por la inyección de calcitonina, una hormona producida por células parafoliculares tiroideas.

Matriz de Hueso

La matriz de hueso representa aproximadamente 90% del peso total de hueso compacto y está compuesta de

hidroxiapatita que se asemeja a fosfato de calcio microcristalino (60%) y colágeno fibrilar tipo I (27%). El 3% restante consiste de tipos de colágeno menores y otras proteínas que incluyen osteocalcina, osteonectina, osteopontina, sialoproteína ósea, así como también proteoglicanos, glicosaminoglicanos y lípidos.

La matriz de hueso también es una fuente principal de información biológica que las células esqueléticas pueden recibir y con lo cual pueden actuar. Por ejemplo, las glicoproteínas y proteoglicanos de la matriz extracelular en el hueso se unen a una variedad de factores de crecimiento y citocinas, y sirven como un depósito de señales almacenadas que actúan sobre osteoblastos y osteoclastos. Los ejemplos de factores de crecimiento y citocinas encontrados en la matriz de hueso incluyen, pero no están limitados a, Proteínas Morfogénicas Óseas (BMPs), Factores de Crecimiento Epidérmicos (EGFs), Factores de Crecimiento de Fibroblastos (FGFs), Factores de Crecimiento Derivados de Plaquetas (PDGFs), Factor de Crecimiento similar a la Insulina-1 (IGF-1), Factores de Crecimiento Transformantes (TGFs), Factores de Crecimiento Derivados del Hueso (BDGFs), Factor de Crecimiento Derivado de Cartílago (CDGF), Factor de Crecimiento Esquelético (hSGF), Interleucina-1 (IL-1) y factores derivados de macrófagos.

Existe un entendimiento insipiente de que las moléculas de la matriz extracelular pueden servir por sí mismas para papeles reguladores, proporcionando tanto efectos biológicos directos sobre células, así como también información espacial y contextual clave.

El Periostio y el Endostio

El periostio es una inversión de tejido conectivo fibroso del hueso, excepto en la superficie articular del hueso. Su adherencia al hueso varía por la ubicación y la edad. En el hueso joven, el periostio se separa fácilmente. En el hueso adulto, está adherido más firmemente, especialmente de modo que en la inserción de tendones y ligamentos, donde más fibras periósticas penetran en el hueso como las fibras perforadoras de Sharpey (manojos de fibras de colágeno que pasan dentro de las laminillas circunferenciales exteriores del hueso). El periostio consiste de dos capas, la capa exterior de la cual está compuesta el tejido conectivo fibroso, grueso que contiene algunas células pero numerosos vasos sanguíneos y nervios. La capa interior, la cual es menos vascular pero más celular, contiene muchas fibras elásticas. Durante el crecimiento, una capa osteogénica de tejido conectivo primitivo forma la capa interior del periostio. En el adulto, ésta es representada solo por una hilera de células

aplanadas, diseminadas aplicadas estrechamente al hueso. El periostio sirve como un lecho de soporte para los vasos sanguíneos y nervios que van al hueso y para el anclaje de tendones y ligamentos. Se sabe que la capa osteogénica, la cual se considera que es una parte del periostio, provee osteoblastos para el crecimiento y la reparación y actúa como una capa limitante importante que controla y restringe el grado de formación de huesos. Debido tanto al periostio como a su hueso contenido son regiones de compartimiento de tejido conectivo, no están separadas entre sí o de otros tejidos conectivos por material laminar basal o membranas basales. Se ha mostrado que las células madre perosteales son importantes en la regeneración y reparación de huesos. (Zhang y colaboradores, 2005, J. Musculoskelet. Neuronal. Interact. 5(4): 360-362).

El endostio reviste la superficie de cavidades dentro de un hueso (cavidad medular y canales centrales) y también la superficie de trabéculas en la cavidad medular. En el hueso en crecimiento, éste consiste de un cuerpo estriado delicado de tejido conectivo reticular mielógeno, detrás del cual se encuentra una capa de osteoblastos. En el adulto, las células osteogénicas se vuelven aplanadas y son indistinguibles como una capa separada. Éstas son capaces de transformarse en células osteogénicas donde existe un estímulo para la formación de huesos, como

después de una fractura.

Médula

La médula es un tejido conectivo suave que ocupa la cavidad medular de los huesos largos, los canales centrales más grandes y la totalidad de los espacios entre las trabéculas del hueso esponjoso. Consiste de un tejido conectivo reticular delicado, en las mallas de las cuales consisten varias clases de células. Se reconocen dos variedades de médula: roja y amarilla. La médula roja es el único tipo encontrado en huesos fetales y jóvenes, pero en el adulto está restringida a las vértebras, esternón, costillas, huesos craneales y epífisis de huesos largos. Es el sitio principal para la génesis de células sanguíneas en el cuerpo adulto. La médula amarilla consiste principalmente de células grasas que han reemplazado gradualmente los otros elementos de la médula. Bajo ciertas condiciones, la médula amarilla de personas viejas o muy delgadas y mal nutridas pierde la mayoría de su grasa y asume un color rojizo y consistencia gelatinosa, conocida como médula gelatinosa. Con estímulos adecuados, la médula amarilla puede reasumir el carácter de médula roja y puede desempeñar una parte activa en el proceso de desarrollo de la sangre.

Osteogénesis u Osificación

La osteogénesis u osificación es un proceso por medio del cual se forman los huesos. Existen tres distintos linajes que generan el esqueleto. Los somitos generan el esqueleto axial, el mesodermo de la placa lateral genera el esqueleto de extremidades y la cresta neural craneal da origen al arco branquial, huesos craneofaciales y cartílago. Existen dos modos principales de formación de huesos, u osteogénesis, y ambos implican la transformación de un tejido mesenquimal preexistente en tejido óseo. La conversión directa de tejido mesenquimal en hueso es llamada la osificación intramembranosa. Este proceso ocurre principalmente en los huesos del cráneo. En otros casos, las células mesenquimales se diferencian en cartílago, el cual posteriormente es reemplazado por hueso. El proceso por medio del cual un intermedio de cartílago se forma y es reemplazado por células óseas es llamado osificación endocondral.

Osificación Intramembranosa

La osificación intramembranosa es la manera característica en la cual los huesos planos de la escápula, el cráneo y el caparazón de tortuga se forman. En la osificación intramembranosa, los huesos desarrollan láminas de tejido conectivo fibroso. Durante la osificación

intramembranosa en el cráneo, las células mesenquimales derivadas de la cresta neural proliferan y se condensan en nódulos compactos. Algunas de estas células se desarrollan en vasos capilares; otras cambian su forma para volverse osteoblastos, células precursoras óseas comprometidas. Los osteoblastos secretan una matriz de colágeno-proteoglicano que es capaz de unirse a sales de calcio. A través de esta unión, la matriz pre-hueso (osteoide) se calcifica. En la mayoría de los casos, los osteoblastos son separados de la región de calcificación por una capa de matriz osteoide que secretan. Ocasionalmente, los osteoblastos son atrapados en la matriz calcificada y se vuelven osteocitos. Conforme procede la calcificación, las espículas óseas irradian fuera de la región donde comienza la osificación, la región completa de espículas calcificadas es rodeada por células mesenquimales compactas que forman el periostio y las células en la superficie interior del periostio también se vuelven osteoblastos y depositan una matriz osteoide paralela a aquella de los espículos existentes. De esta manera, se forman muchas capas de hueso.

La osificación intramembranosa se caracteriza por la invasión de tubos capilares en la zona mesenquimal y el surgimiento y diferenciación de células mesenquimales en osteoblastos maduros, los cuales depositan constitutivamente una matriz ósea que conduce a la

formación de espículos óseas, los cuales crecen y se desarrollan, fusionándose eventualmente con otros espículos para formar trabéculas. Conforme las trabéculas incrementan su tamaño y el número, éstas son interconectadas formando un hueso tejido (una estructura débil desorganizada con una alta proporción de osteocitos), el cual es reemplazado eventualmente por hueso laminar, más fuerte, más organizado.

El mecanismo molecular de la osificación intramembranosa involucra las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) y la activación de un factor de transcripción llamado CBFA1. Las proteínas morfogenéticas óseas, por ejemplo, BMP2, BMP4 y BMP7, de la epidermis de la cabeza se piensa que instruyen a las células mesenquimales derivadas de la cresta neural para volverse directamente células óseas. Las BMPs activan el gen de Cbfa1 en células mesenquimales. Se sabe que el factor de transcripción de CBFA1 transforma las células mesenquimales en osteoblastos. Los estudios han mostrado que el ARNm para CBFA1 de ratón está restringido en gran medida a condensaciones mesenquimales que forman hueso y está limitado al linaje de osteoblastos. Se sabe que el CBFA1 activa los genes para osteocalcina, osteopontina y otras proteínas de matriz extracelular específicas para huesos.

Osificación Endocondral (Osificación Intracartilaginosa)

La osificación endocondral, la cual implica la formación in vivo de tejido de cartílago de células mesenquimales agregadas y el reemplazo subsecuente de tejido de cartílago por hueso, se puede dividir en cinco etapas. Los componentes esqueléticos de la columna vertebral, la pelvis y las extremidades se forman primero de cartílago y posteriormente se vuelve hueso.

En primer lugar, las células mesenquimales se comprometen para hacer células de cartílago. Este compromiso es causado por factores paracrinos que inducen las células mesodérmicas cercanas para expresar dos factores de transcripción, Pax1 y Scleraxis. Se sabe que estos factores de transcripción activan genes específicos para cartílago. Por ejemplo, Scleraxis es expresado en la mesénquima del esclerotomo, en la mesénquima facial que forma precursores cartilaginosos para hueso y en la mesénquima de extremidades.

Durante la segunda fase de la osificación endocondral, las células de mesénquima comprometidas se condensan en nódulos compactos y se diferencian en condrocitos (células de cartílago que producen y mantienen la matriz cartilaginosa, la cual consiste principalmente de colágeno y proteoglicanos). Los estudios han mostrado que

la N-cadherina es importante en el inicio de esas condensaciones y N-CAM es importante para mantenerlas. En humanos, el gen de SOX9, el cual codifica una proteína que se une al ADN, es expresado en las condensaciones precartilaginosas.

Durante la tercera fase de la osificación endocondral, los condrocitos proliferan rápidamente para formar el modelo para el hueso. Conforme se dividen, los condrocitos secretan una matriz extracelular específica para cartílago.

En la cuarta fase, los condrocitos detienen la división e incrementan su volumen dramáticamente, volviéndose condrocitos hipertróficos. Estos condrocitos grandes alteran la matriz que producen (al agregar colágeno X y más fibronectina) para hacer posible que sean mineralizados por carbonato de calcio.

La quinta fase involucra la invasión del modelo de cartílago por vasos sanguíneos. Los condrocitos hipertróficos mueren por la apoptosis y este espacio se vuelve médula ósea. Conforme las células de cartílago mueren, un grupo de células que han rodeado el modelo de cartílago se diferencian en osteoblastos, los cuales comienzan a formar matriz ósea en el cartílago parcialmente degradado. Eventualmente, todo el cartílago es reemplazado por hueso. De esta manera, el tejido de cartílago sirve

como un modelo para el hueso que sigue.

El reemplazo de condrocitos por células óseas es dependiente de la mineralización de la matriz extracelular. Una variedad de eventos conducen a la hipertrofia y mineralización de los condrocitos, incluyendo un cambio inicial de respiración aeróbica a respiración anaeróbica, lo cual altera su metabolismo celular y potencial de energía mitocondrial. Los condrocitos hipertróficos secretan numerosas vesículas unidas a la membrana pequeñas dentro de la matriz extracelular. Estas vesículas contienen enzimas que son activas en la generación de iones de calcio y fosfato e inician el proceso de mineralización dentro de la matriz cartilaginosa. Los condrocitos hipertróficos, su metabolismo y membranas mitocondriales se alteran, luego mueren por la apoptosis.

En los huesos largos de muchos mamíferos (inclusive los humanos), la osificación endocondral se esparce hacia ambas direcciones desde el centro del hueso. Conforme el frente de la osificación se acerca a los extremos del modelo de cartílago, los condrocitos cerca del frente de osificación proliferan antes de experimentar hipertrofia, empujando hacia fuera los extremos cartilaginosos del hueso. Las áreas cartilaginosas en los extremos de los huesos largos son llamadas placas de crecimiento epifisario. Estas placas contienen tres

regiones: una región de proliferación de condrocitos, una región de condrocitos maduros y una región de condrocitos hipertróficos. Conforme las hipertrofias de cartílago interior y el frente de osificación se extienden más hacia afuera, el cartílago restante en la placa de crecimiento epifisario prolifera. Siempre y cuando las placas de crecimiento epifisario sean capaces de producir condrocitos, el hueso continúa creciendo.

Remodelación Ósea

El hueso es roto constantemente por osteoclastos y reformado por osteoblastos en el adulto. Se ha reportado que tanto como 18% del hueso es reciclado cada año a través del proceso de renovación, conocido como remodelación ósea, lo cual mantiene la rigidez del hueso. El balance en este proceso dinámico cambia conforme la gente envejece: en la juventud, éste favorece la formación de hueso, pero en la vejez, favorece la resorción.

Conforme se agrega periféricamente nuevo material óseo de la superficie interna del periostio, hay un ahuecamiento de la región interna para formar la cavidad de la médula ósea. Esta destrucción del tejido óseo es debida a osteoclastos que entran al hueso a través de los vasos sanguíneos. Los osteoclastos disuelven tanto las porciones inorgánicas como las porciones de proteína de la matriz

ósea. Cada osteoclasto se extiende en numerosos procesos celulares dentro de la matriz y bombea iones de hidrógeno sobre el material circundante, acidificándolo y solubilizándolo de esa manera. Los vasos sanguíneos también importan las células formadoras de sangre que residirán en la médula por la duración de la vida del organismo.

El número y la actividad de los osteoclastos deben ser regulados estrictamente. Si hay muchos osteoclastos activos, mucho hueso se disolverá y resultará la osteoporosis. A la inversa, si no se producen suficientes osteoclastos, los huesos no se ahuecan para la médula y resultará la osteopetrosis (conocida como enfermedad de huesos piedra, un trastorno por medio del cual los huesos se endurecen y se vuelven más densos).

Regeneración Ósea y Reparación de Fracturas

Una fractura, como cualquier lesión traumática, causa hemorragia y destrucción de tejido. Los primeros cambios reparadores son característicos de esta manera de aquellos que ocurren en cualquier lesión de tejido suave. Los fibroblastos proliferativos y los brotes capilares crecen dentro del coágulo sanguíneo y el área lesionada, formando de esta manera tejido de granulación. El área también es invadida por leucocitos polimorfonucleares y posteriormente por macrófagos que destruyen los restos de tejido. El tejido de granulación se vuelve más denso

gradualmente, y en partes de éste, se forma cartílago. Este tejido conectivo y cartílago recientemente formados se designan como un callo. Éste sirve temporalmente en la estabilización y unión del hueso fracturado. Conforme está teniendo lugar este proceso, las células osteogénicas inactivas del periostio se agrandan y se vuelven osteoblastos activos. En el exterior del hueso fracturado, al principio a alguna distancia de la fractura, se deposita tejido óseo. Esta formación de hueso nuevo continúa hacia los extremos fracturados del hueso y forma finalmente una capa similar a una vaina del hueso sobre el callo fibrocartilaginoso. Conforme incrementa la cantidad de hueso, los brotes osteogénicos invaden el callo fibroso y cartilaginoso y lo reemplazan por un callo óseo. El cartílago experimenta la calcificación y absorción en el reemplazo del callo fibrocartilaginoso y la formación de hueso intramembranoso también tiene lugar. El hueso recientemente formado es al principio un tipo esponjoso y no compacto, y el callo se reduce en su diámetro. Al momento cuando esta formación de hueso subperióstico está teniendo lugar, el hueso también se forma en la cavidad medular. El hueso medular que crece centripetalmente desde cada lado de la fractura se unifica, ayudando de esta manera a la unión ósea.

El proceso de reparación es, en general, un

proceso ordenado, pero varía en gran medida con el desplazamiento de los extremos fracturados del hueso y el grado de traumatismo infligido. Las superficies disparejas o protuberantes se retiran gradualmente y el hueso curado, especialmente, en individuos jóvenes, asume su contorno original.

Osteogénesis y Angiogénesis

El desarrollo esquelético y la reparación de fracturas incluyen la coordinación de múltiples eventos tales como migración, diferenciación y activación de múltiples tipos de células y tejidos. El desarrollo de una microvasculatura y microcirculación es importante para la homeostasis y la regeneración de hueso vivo, sin lo cual el tejido se degeneraría y moriría. Los desarrollos recientes utilizando modelos in vitro e in vivo de osteogénesis y reparación de fracturas han proporcionado un mejor entendimiento de la naturaleza de reclutamiento de la vasculatura en el desarrollo y reparación del esqueleto.

La vasculatura transporta oxígeno, nutrientes, factores solubles y numerosos tipos de células a todos los tejidos en el cuerpo. El crecimiento y el desarrollo de una estructura vascular madura es uno de los primeros eventos en la organogénesis. En el desarrollo embriónico de mamíferos, las redes vasculares incipientes se desarrollan

mediante la agregación de la formación de nuevo de angioblastos en un plexo vascular primitivo (vasculogénesis). Éste experimenta un proceso de remodelación complejo en el cual el brote, la conexión y el crecimiento de vasos existentes (angiogénesis) conduce al comienzo de un sistema circulatorio funcional.

Los factores y eventos que conducen al desarrollo normal de la vasculatura embriónica se recapitulan durante situaciones de neoangiogénesis en el adulto. Existe una variedad de factores involucrados en la neoangiogénesis; éstos incluyen, pero no están limitados a, el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), Factor de Crecimiento de Fibroblastos básico (bFGF), varios miembros de la familia del Factor de Crecimiento Transformante β (TGFβ) y el Factor de Transcripción Inducible por Hipoxia (HIF). Otros factores que tienen propiedades angiogénicas incluyen las Angiopoyetinas, (Ang-1); Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF); Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF); familia del Factor de Crecimiento similar a la Insulina (IGF-1, IGF-2) y Neurotrofinas (NGF).

Los VEGFs y sus receptores correspondientes son reguladores claves en una cascada de eventos moleculares y celulares que conducen finalmente al desarrollo del sistema vascular, ya sea por medio de la vasculogénesis, angiogénesis o en la formación del sistema vascular

linfático. Aunque el VEGF es un regulador crucial en la angiogénesis fisiológica, también desempeña un papel significativo en el crecimiento y reparación del esqueleto.

En la vasculatura establecida madura, el endotelio desempeña un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis del tejido circundante al proporcionar la red comunicativa para que los tejidos adyacentes respondan a requerimientos como sea necesario. Adicionalmente, la vasculatura proporciona factores de crecimiento, hormonas, citocinas, quimiocinas y metabolitos, y similares, que son necesitados por el tejido circundante y actúan como una barrera para limitar el movimiento de moléculas y células. Las señales y factores de atracción expresados en el endotelio del hueso ayudan a reclutar células circulantes, particularmente células hematopoyéticas, para la médula ósea y se coordinan con células metastáticas para dirigirlas a regiones esqueléticas. De esta manera, cualquier alteración en el suministro vascular al tejido óseo puede conducir a patologías esqueléticas, tales como osteonecrosis (muerte del hueso causada por un flujo reducido de sangre a los huesos), osteomielitis (infección del hueso o médula ósea por un microorganismo) y osteoporosis (pérdida de densidad ósea). Se ha descubierto que una variedad de factores tienen un efecto prominente sobre la patología de la vasculatura y el esqueleto, que

incluyen la Osteoprotegerina (OPG), la cual inhibe el activador de receptores de la resorción ósea osteoclastogénica inducida por el ligando de NF-kB (RANKL).

La osificación de los huesos tanto intramembranosa como endocondral ocurre en contigüidad al crecimiento hacia adentro vascular. En la osificación endocondral, el acoplamiento de la condrogénesis y la osteogénesis para determinar la velocidad de osificación de los huesos es dependiente del nivel de vascularización de la placa de crecimiento. Por ejemplo, las isoformas del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) son esenciales en la coordinación de la vascularización metafisaria y epifisaria, formación de cartílago y osificación durante el desarrollo óseo endocondral. El HIF-1 estimula la transcripción del gen de VEGF (y de otros genes cuyos productos son necesarios cuando el oxígeno está en un suministro corto). La proteína de VEGF es secretada, se difunde a través del tejido y actúa en células endoteliales cercanas.

La respuesta de las células endoteliales incluye por lo menos cuatro componentes. En primer lugar, las células producen proteasas para asimilar su vía a través de la lámina basal del tubo capilar o vénula precursor. En segundo lugar, las células endoteliales emigran hacia la fuente de la señal. En tercer lugar, las células

proliferan. En cuarto lugar, las células forman tubos y se diferencian. El VEGF actúa selectivamente sobre células endoteliales para estimular este conjunto completo de efectos. Otros factores de crecimiento, que incluyen algunos miembros de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos, también pueden estimular la angiogénesis, pero influyen sobre otros tipos de células además de las células endoteliales. Conforme se forman los nuevos vasos, que conectan la sangre al tejido, la concentración de oxígeno se eleva, la actividad de HIF-1 desciende, la producción de VEGF termina y la angiogénesis cesa.

La vascularización de regiones de cartílago en los huesos largos ocurre en diferentes etapas de desarrollo. En el desarrollo embriónico temprano, los vasos sanguíneos que se originan del pericondrio invaginan dentro de las estructuras de cartílago. Durante el crecimiento postnatal elevado, los tubos capilares invaden la placa de crecimiento de los huesos largos. En la adultez, la angiogénesis puede ser activada periódicamente durante la remodelación ósea en respuesta a un traumatismo óseo o condiciones patofisiológicas tales como artritis reumatoide (RA) y osteoartritis (OA).

El hueso tiene la única capacidad para regenerarse sin el desarrollo de una cicatriz fibrosa, lo cual es sintomático de la curación de heridas de tejido

suave. Esto se logra a través de etapas interdependientes complejas del proceso de curación, las cuales imitan el desarrollo estrictamente regulado del esqueleto. Después de un traumatismo con daño al sistema musculoesquelético, la alteración de la vasculatura conduce a necrosis aguda e hipoxia del tejido circundante. Esta alteración de la circulación conduce a la activación de factores trombóticos en una cascada de coagulación que conduce a la formación de un hematoma. La respuesta inflamatoria y la descomposición de tejido activan factores tales como citocinas y factores de crecimiento que reclutan células osteoprogenitoras y mesenquimales para el sitio de la fractura. La estimulación de la circulación endosteal en el hueso fracturado permite que las células mesenquimales asociadas con el crecimiento de tubos capilares invadan la región herida del endostio y la médula ósea. En el borde de una fractura de hueso, el tejido de granulación formado transitoriamente es reemplazado por fibrocartílago. Concomitantemente, el periostio experimenta directamente la formación de hueso intramembranoso que conduce a la formación de un callo externo; mientras que internamente, el tejido está siendo mineralizado para formar hueso tejido. Después de la estabilización del tejido óseo y la vasculatura en la fractura de hueso, la cascada de remodelación mediada por células se activa donde la remoción osteoclástica de hueso

necrótico es seguida por el reemplazo del callo de fractura grande por hueso laminar, el tamaño del callo se reduce y el suministro vascular normal se restaura.

Una pluralidad de mediadores asociados con el desarrollo óseo fetal y postnatal desempeñan un papel prominente en la respuesta en cascada en la reparación de fracturas de hueso. Estos incluyen pero no están limitados a BMP-2 y 4, VEGF, bFGF, TGF-β y PDGF. La expresión de VEGF se detecta en los condroblastos, condrocitos, células osteoprogenitoras y osteoblastos en el callo de la fractura donde se expresa elevadamente en angioblastos, células osteoprogenitoras y osteoblastos durante los primeros siete días de curación pero disminuye después de once días. Adicionalmente, los osteoclastos liberan heparinasa que induce la liberación de la forma activa de VEGF de heparina, activando no solo la angiogénesis, sino también el reclutamiento, diferenciación y actividad de osteoclastos lo que conduce a la remodelación de callo de la fractura durante la osificación endocondral. Las fracturas en algunos casos no logran la reparación o unión dando por resultado pseudoartrosis rellena de fibras. Una variedad de factores contribuyentes puede conducir a la falta de unión o unión retrasada de fracturas de huesos, tales como, pero no limitados a, fármacos anti-inflamatorios, esteroides, Vitamina C, Vitamina D y

deficiencias de calcio, hábito de fumar, diabetes y otros trastornos fisiológicos.

La ausencia de una red vascular funcional también es un factor importante en la falta de curación de huesos en fracturas sin unión. Los estudios han reportado que los factores angiogénicos liberados de andamios biomiméticos pueden aumentar la regeneración ósea y que las estrategias en combinación que liberan factores tanto angiogénicos como osteogénicos pueden aumentar la capacidad regenerativa del hueso.

La temporización secuencial crucial de la diferenciación y activación de osteoclastos, angiogénesis, reclutamiento de células osteoprogenitoras y la liberación de factores de crecimiento tal como BMP-2 en la osteogénesis y reparación de fracturas se pueden aumentar por medio de la producción endógena sincronizada de mediadores angiogénicos y osteogénicos. Los estudios en lesiones por perforación femoral en ratas han mostrado la expresión diferencial de isoformas de empalme de VEGF junto con sus receptores, lo que indica un papel importante en el proceso de curación de huesos. Otros estudios han demostrado que la angiogénesis ocurre predominantemente antes del inicio de la osteogénesis en el alargamiento de huesos en un modelo de distracción de osteogénesis.

Otro factor de crecimiento inductor de la

angiogénesis, FGF-2, puede acelerar la reparación de fracturas cuando se agrega de manera exógena a la etapa de curación temprana de un hueso. Aunque el mecanismo no ha sido esclarecido completamente, tiene la capacidad de estimular la angiogénesis y la proliferación y diferenciación de osteoblastos para ayudar posiblemente a la reparación de fracturas de huesos.

2.3. Compartimentos de Tejido Cartilaginoso

Los compartimentos de tejido cartilaginoso son compartimentos de tejido conectivo especializados que comprenden células de cartílago, conocidas como condrocitos, fibras de cartílago y sustancia molida que constituye la matriz de cartílago, que contribuyen colectivamente a la firmeza elástica característica que hace que el cartílago sea capaz de resistir altos niveles de presión o esfuerzo cortante. El cartílago se clasifica histológicamente en tres tipos dependiendo de su composición molecular: cartílago hialino; fibrocartílago y cartílago elástico.

El cartílago hialino es la forma predominante de cartílago que comprende una matriz amorfa que rodea condrocitos incorporados dentro de espacios, conocidos como lagunas. El cartílago hialino, el cual está asociado comúnmente con el sistema esquelético y se encuentra en la

nariz, tráquea, bronquios y laringe, funciona predominantemente para proporcionar soporte. El cartílago hialino asociado con las porciones articulares de huesos, que forman el componente principal de articulaciones sinoviales, se denomina cartílago articular. El cartílago hialino es usualmente avascular excepto donde los vasos pasan a través para suministrar a otros tejidos y en centros de osificación involucrados en el desarrollo de hueso intracartilaginoso.

El fibrocartílago, el cual se encuentra comúnmente en discos intervertebrales y sínfisis púbica y funciona para proporcionar resistencia a la tensión y en la absorción de choques, es menos firme que el cartílago hialino. Éste comprende una combinación de fibras de colágeno densas con células de cartílago y una matriz de cartílago escasa. El fibrocartílago no está circunscrito usualmente por un pericondrio. Las proporciones de células, fibras y componentes de ECM en el fribrocartílago son variables.

El cartílago elástico, el cual se encuentra en la oreja externa, el tubo Eustaquiano, la epiglotis y algunos de los cartílagos lanríngeos, se caracteriza por un gran número de fibras elásticas que se ramifican y cursan en todas direcciones para formar una red densa de fibras de anastomosis y entrelazado.

Matriz de Cartílago Articular

Los condrocitos en el cartílago articular están rodeados por una región angosta de ECM de tejido conectivo, denominada la matriz pericelular (PCM), la cual junto con el condrocito, se denomina condrón. La PCM, la cual es muy rica en fibronectina, proteoglicanos (por ejemplo, agrecano, hialurón y decorina) y colágeno (tipos II, VI y IX), se caracteriza particularmente por una alta concentración de colágeno tipo VI en comparación con la ECM circundante. En el cartílago articular normal, el colágeno tipo VI está restringido a los condrones, pero en el cartílago osteoartrítico, es regulado por incremento y se encuentra por toda la ECM. Un análisis proteómico de cartílago articular reveló la presencia del C-propéptido de colágeno α1(II), C-propéptido de colágeno α1(XI), C-propéptido de colágeno α2(XI), colágeno α1(VI), colágeno α2(VI), proteína de unión, biglicano, decorina, osteonectina, matrilina-1, anexina-V, lactaderina y proteína de inmunoglobulina de unión (BiP), además de proteínas metabólicas. (Wilson ***y colaboradores,*** 2008, Methods, 48: 22-31).

Diferenciación de Condrocitos

La estructura específica del cartílago articular, con condrocitos endógenos que forman articulaciones

adultas, es el resultado de la osificación endocondral, como se describiera anteriormente bajo el subtítulo, Formación de Compartimientos de Tejido Óseo.

La diferenciación y mantenimiento de condrocitos en un cartílago articular es gobernada por la interacción de múltiples factores. Los protagonistas clave incluyen, pero no están limitados a, iones (por ejemplo, calcio); esteroides (por ejemplo, estrógenos); terpenoides (por ejemplo, ácido retinoico); péptidos (por ejemplo, hormona paratiroidea (PTH), péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP)), factores de crecimiento de insulina (por ejemplo, hormonas de TGFβ que incluyen, sin limitación, BMPs, IGF-1, VEGF, PDGF, FGF); factores de transcripción (por ejemplo, Wnt, SOX-9); eicosanoides (por ejemplo, prostaglandinas); interleucinas catabólicas (por ejemplo, IL-1); interleucinas anabólicas (por ejemplo, IL-6, IL-4 e IL-10). (Gaissmaier y colaboradores, 2008, Int. J. Care Injured, 39S1:S88-S96).

Placa de Crecimiento

Las placas epifisarias o placas de crecimiento son una placa de cartílago hialino localizada en la metáfisis en el extremo de huesos largos. Mientras que la osificación endocondral es responsable de la formación de cartílago en el útero y en los niños, las placas de crecimiento son responsables del crecimiento longitudinal de huesos largos

por vía de una plantilla de cartílago. Los procesos de desarrollo actuales de la proliferación y la diferenciación dentro de las placas de crecimiento son mediados por una variedad de factores hormonales y paracrinos secretados por los condrocitos de la placa de crecimiento. La placa de crecimiento es una estructura sumamente organizada que comprende un gran número de condrocitos en varias etapas de diferenciación y proliferación incorporadas en un andamio de componentes de ECM.

La placa de crecimiento puede subdividirse en cuatro zonas dependiendo de la etapa de diferenciación y distribución espacial de los tipos de colágeno. La zona en reposo es la zona más pequeña cerca del cartílago epifisario que comprende pequeños condrocitos monomórficos con un borde angosto de citoplasma. Los condrocitos de la zona en reposo secretan un factor de orientación de la placa de crecimiento (GPOF) que alinean las células proliferantes paralelas al eje largo del hueso en desarrollo. Las células similares a células madre de la zona en reposo tienen una capacidad proliferativa limitada, lo cual conduce eventualmente a la fusión de la placa de crecimiento (fusión epifisaria). La zona proliferativa de la placa de crecimiento comprende condrocitos que se ordenan en columnas características que son paralelas al eje longitudinal del hueso y están separadas por ECM con

alto contenido de colágeno tipo II. Los condrocitos de la zona proliferativa son mitóticamente activos, tienen un alto contenido de oxígeno y glicógeno y exhiben una producción de ATP mitocondrial incrementada. La zona hipertrófica se refiere a la zona más lejana de la zona de reposo donde los condrocitos pre-hipertróficos detienen la división y se diferencian terminalmente en condrocitos hipertróficos alargados incorporados en la ECM con alto contenido de colágeno tipo X. Los condrocitos hipertróficos tienen una alta concentración de calcio intracelular requerida para la producción de vesículas de liberación que contienen anexinas que se unen a Ca^{2+}, que secretan fosfato de calcio, hidroxiapatita, fosfatasas (tal como fosfatasa alcalina), metaloproteinasas, todos los cuales sirven para la remodelación proteolítica y mineralización de la matriz circundante. Los condrocitos hipertróficos producen factores, tal como VEGF, que inician la vascularización de la matriz mineralizada que luego se degradan por la invasión de condroclastos y osteoclastos fagocíticos que constituyen la zona de invasión.

Los procesos de desarrollo que involucran la condrogénesis son regulados por una interacción de un gran número de hormonas sistémicas y factores paracrinos, que incluyen factores de crecimiento, citocinas y factores de transcripción. La Tabla 8 lista factores clave involucrados

en la proliferación y diferenciación de condrocitos en la placa de crecimiento. (Brochhausen y colaboradores, J. Tissue Eng. Regen. Med. 2009, 3: 416-429).

Tabla 8. Sumario de Factores Clave Involucrados en la Proliferación y Diferenciación de Condrocitos en la Placa de Crecimiento

Nombre	Clase	Expresión	Efecto
ATF-2	Factor de transcripción	Condrocitos en reposo; condrocitos proliferativos	Apoptosis
Bcl-2	Proteína de la membrana mitocondrial interior	Condrocitos proliferativos; condrocitos pre-hipertróficos	Apoptosis
Ihh	Molécula de señalización	Condrocitos pre-hipertróficos	Proliferación
PTHrP	Hormona peptídica	Condrocitos Periarticulares del pericondrio	Proliferación
BMP	Factores de crecimiento de la superfamilia de TGF-β	Condrocitos pre-hipertróficos	Formación de cartílago; proliferación
PGE_2	Mediador de lípidos	Todas las zonas de la placa de crecimiento	Síntesis de matriz de proliferación
MMP	Metaloproteinasa	Condrocitos hipertróficos; condroclastos	Apoptosis; degradación de matriz de vascularización

Sox	Factor de transcripción	Condrocitos en reposo y proliferativos; condrocitos hipertróficos	Diferenciación; proliferación;
Runx 2 (Cbfa 1)	Factor de transcripción	Condrocitos hipertróficos	Diferenciación terminal; mineralización de matriz
NOTCH	Proteína transmembrana de paso individual	Condrocitos pre-hipertróficos e hipertróficos	Inhibe la diferenciación terminal
HOX	Factores de transcripción de caja homeo	Condrocitos hipertróficos	Activa genes osteogénicos
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos	Condrocitos proliferativos	Antiproliferación

Células Madre de Compartimentos de Tejido Cartilaginoso

Las células progenitoras mesenquimales multipotentes con potencial adipogénico, osteogénico y condrogénico, y que son CD105+/CD166+ (que corresponden al receptor de TGF-β tipo III (endoglina) y ALCAM, respectivamente), han sido identificadas en el cartílago articular. (Asalameh y colaboradores, Arthritis & Rheumatism, 2004, 50(5): 1522-1532). La presencia de células madre mesenquimales CD34-/CD45-/CD44+/CD73+/CD90+

con potencial adipogénico, condrogénico y osteogénico también se ha mostrado. (Peng y colaboradores, Stem Cells and Development (2008), 17: 761-774). De manera similar a las MSCs derivadas del hueso, Las MSCs derivadas de articulaciones son positivas para la expresión en la superficie de Notch-1. (Hiraoka y colaboradores, Biorheology, 2006, 43: 447-454). Un nicho de MSC potencial positivo para Stro-1, Jagged-1 y BMPr1a también ha sido identificado en la zona pericondrial de Ranvier en la placa de crecimiento. (Karlsson y colaboradores, 2009, J. Anat. 215(3): 355-63).

La expresión diferencial de marcadores Notch-1, Stro-1 y VCAM-1/CD106 ha sido observada en el cartílago articular normal contra el cartílago osteoartrítico (OA). En el cartílago normal, la expresión de esos marcadores es más alta en la zona superficial (SZ) en comparación con la zona intermedia (MZ) y la zona profunda (DZ). Por otra parte, el cartílago OA en SZ tiene células positivas para Notch-1 y Sox-9 reducidas mientras que en MZ tiene células positivas para Notch-1, Stro-1 y VCAM-1 incrementadas. (Grogan y colaboradores, Arthritis Res. Ther. 2009, 11(3): R85-R97).

Compartimentos de Tejido de Fibrocartílago de Discos Intervertebrales

Los discos intervertebrales (IVD) están

comprendidos predominantemente de fibrocartílago. El fibrocartílago de IVD es continuo tanto con como debajo del cartílago articular de vértebras adyacentes, así como también periféricamente con ligamentos espinales. El IVD es una estructura única que contiene anillos fibrosos (AF) y núcleos pulposos (NP), un remanente elipsoidal gelatinoso del ligamento de la columna embriónico y es conmutado entre dos placas finales cartilaginosas adyacentes (EP). La ruptura y formación de hernias de IVD del núcleo pulposo dentro de la médula espinal pueden causar un dolor grave y otros síntomas neurológicos. El NP y el AF funcionan sinérgicamente para lograr el papel principal del IVD en la transferencia de carga, disipación de energía y facilitación en la movilidad de articulaciones.

El IVD de adulto es esencialmente avascular; por lo tanto, las células endógenas sobreviven en un microambiente con bajo contenido de nutrientes y bajo contenido de oxígeno. Los componentes de ECM principales del IVD incluyen pero no están limitados a agrecano, colágeno (por ejemplo, tipos I, II y IX), proteínas de repetición ricas en leucina (LRR) y proteoglicanos (por ejemplo, fibromodulina, decorina, lumican), proteína de oligomatriz de cartílago y red de filamentos con gránulos de colágeno VI. (Feng y colaborares, 2006, J. Bone Joint Surg. Am. 88: 25-29). El contenido de agua, el contenido de

GAG, los niveles de agrecano y los niveles de colágeno tipo II son significativamente más bajos en discos más viejos lo que demuestra los efectos de la degeneración de IVD con la edad. (Murakami y colaboradores, 2010, Med. Biol. Eng. Comput. 48: 469-474).

El núcleo pulposo central (NP) es rico en agrecano y hialurón. El NP en desarrollo se caracteriza por la presencia de condrocitos sumamente vacuolizados y pequeños condroblastos heredados del ligamento de la columna. Funcionando principalmente como un soporte axial primitivo, la integridad del ligamento de la columna es mantenida por una vaina rica en proteoglicano (PG) y laminina. Conforme el NP madura, la composición celular se vuelve predominantemente condrocítica. Las células de NP maduras son pequeñas y tienen una matriz rica en agrecano, lo cual es esencial en el mantenimiento de niveles de hidratación necesarios para la función mecánica. Su perfil de expresión de genes y la actividad metabólica son distintos de los condrocitos del cartílago articular. La ECM de NP inmaduro tiene altos niveles de agrecano y contiene principalmente colágeno tipo II, con la isoforma tipo IIA expresada por células progenitoras durante la condrogénesis, no por condrocitos maduros. (Hsieh A.H. y Tworney J.D., J. Biomech, 2010, 43(1): 137-156).

El AF rodea el NP con capas de láminas

unidireccionales de colágeno paralelas a la circunferencia de un disco para formar láminas de colágeno. Las fibras de colágeno bidireccionales alternativas diseminan las láminas de colágeno de AF. El AF se puede subdividir en tres regiones: AF interior, AF intermedio y AF exterior. El AF interior surge junto con la formación endocondral de las vértebras. El AF exterior surge como una condensación de células separada con una formación de matriz más lenta. Las laminillas del AF interior comprenden predominantemente colágeno tipo II y fibrocondrocitos, mientras que aquellas del AF exterior están comprendidas de colágeno tipo I y fibroblastos. Una población de células interlaminares en forma de panqueque, así como también fibras de elastina también se encuentran dentro de las laminillas, en uniones vertebrales y en la zona interfacial de NP-AF. Los proteoglicanos grandes (PGs; por ejemplo agrecano y versicano) y el colágeno tipo I y VI permean la ECM interlaminar y translaminar. (Hsieh A.H. y Tworney J.D., J. Biomech., 2010, 43(1): 137-156).

Una gran variedad de señales coordinadas que se originan de las células del ligamento de la columna y de la capa de piso del tubo neural embrionario sirven para la embriogénesis de discos. Las señales clave incluyen, pero no están limitadas a, sonic hedgehog (Shh), Wnt, noggin, familia de Pax de factores de transcripción (por ejemplo,

Pax 1 y *Pax 9*), familia de Sox de factores de transcripción (*Sox5, Sox6* y *Sox*) y TGF-β. (Smith y colaboradores, 2011, Dis Model Mech. 4(1):31-41). La formación de hernias y degeneración de IVD están asociadas con cambios en perfiles de citocinas inflamatorias e inmunes, que incluyen, pero no están limitados a, la activación de citocinas relacionadas con Th1 (por ejemplo IFNγ) así como también citocinas relacionadas con Th17 (por ejemplo, IL-4, IL-6, IL-12 e IL-17). (Shamji y colaboradores, 2010, Arthritis & Rheumatism, 62(7): 1974-1982).

Un nicho de células madre potenciales comprendido de células progenitoras que son positivas para Notch1, Delta4, Jagged1, CD117, Stro-1 y Ki67 ha sido identificado en discos intervertebrales de una variedad de animales, que incluyen los humanos. Se ha reportado que los compartimentos de tejido de IVD comprenden una zona de crecimiento lento en las regiones de AF así como también las regiones de NP. (Henriksson y colaboradores, 2009, SPINE, 34(21): 2278-2287).

2.4. Compartimentos de Tejido Dental

Un diente tiene tres divisiones anatómicas (corona, raíz y cuello) y cuatro componentes estructurales (esmalte, dentina, cemento y pulpa).

El esmalte es el tejido biológico más

mineralizado, más duro en el cuerpo humano. Está comprendido de cristalitos alargados de hidroxiapatita reunidos en varillas o prismas, entremezclados con inter-varillas cristalinas que rellenan el espacio intersticial. Las células de esmalte, conocidas como ameloblastos, son responsables del desarrollo del esmalte. La ameloblastina, TRAP y enamelina son proteínas clave encontradas en el tejido del esmalte mientras que la matriz de esmalte está desprovista de colágeno, compuesto principalmente de amelogenina. Una organización intrincada de factores de señalización, tales como BMPs (por ejemplo, BMP-2, BMP-4, BMP-7), FGFs (por ejemplo, FGF-3, -4, -9, -20), Wnt-3, 10a, 10b y factores de transcripción, tales como p21, Msx2 y Lef1 es responsable de la morfogénesis del esmalte. El autoensamblaje de amelógenos para formar nanoesferas de amelogenina desempeña un papel en la nucleación de la cristalización de hidroxiapatita y la mineralización de esmalte. Las enzimas de procesamiento de matriz, tales como MMP-20, kalicreína-4 (KLK4), también conocida como serina proteasa de matriz de esmalte -1 (EMSP-1), están involucradas en la eliminación completa de la matriz de proteínas y el reemplazo por una matriz mineralizada. (Fong y colaboradores, 2005, J. Dent. Educ., 69(5): 555-570). Los ameloblastos surgen de células madre epiteliales de origen ectodérmico. Éstos se pierden después de la erupción del

diente dejando sin células madre ectodérmicas de humano adultas el esmalte maduro. En contraste, el esmalte de roedor retiene un nicho de células madre epiteliales, conocidas como células del brote apical, para la producción continua de esmalte. (Ulmer y colaboradores, 2010, Schweiz Monatsschr Zahnmed, 120:860-872).

La dentina es un compartimento de tejido conectivo vivo duro, amarillento y elástico con propiedades biomecánicas similares al hueso. La formación de dentina es impulsada por odontoblastos maduros derivados de la mesénquima que se diferencian completamente y no se dividen y que forman una capa individual debajo de la dentina en un diente maduro. Una serie de interacciones epiteliales-mesenquimales regulan la diferenciación de odontoblastos de células de la cresta neural en los primeros procesos de arco branquial y frontonasal. La dentina madura está comprendida de un manto, compuesto de dentina intertubular y peritubular hecha de una matriz de fibrillas de colágeno, con procesos de células de odontoblastos que se extienden dentro de túbulos de dentina. Durante la dentinogénesis, los odontoblastos secretan predentina, un tejido mineralizado compuesto de colágeno tipo I. A diferencia de la osteogénesis, en la dentinogénesis, conforme se forma la capa de predentina, los odontoblastos retroceden en lugar de ser incorporados dentro de la matriz de dentina, dejando

detrás procesos de células dentro de túbulos dentinales. Subsecuentemente, la predentina no mineralizada se convierte en dentina por medio de la mineralización gradual de colágeno. La dentinogénesis es dirigida por una serie de eventos bioquímicos sumamente controlados que dirigen las velocidades de secreción de colágeno, su maduración en fibrillas gruesas, la pérdida de proteoglicanos, la formación de minerales que incluyen la cristalización de hidroxi-apatita y el crecimiento. La matriz de dentina está compuesta principalmente de colágenos (por ejemplo, tipos I, III y V) así como también otras proteínas de matriz que incluyen, pero no están limitadas a, proteínas de matriz fosforiladas y no fosforiladas, proteoglicanos, factores de crecimiento, metaloproteinasas, proteínas derivadas de suero de fosfatasa alcalina y fosfolípidos. (Fong y colaboradores, 2005, J. Dent. Educ, 69(5): 555-570). No se han identificado células madre en la dentina madura.

La pulpa dental es el tejido vivo de los dientes que responde al dolor y al daño e inicia la reparación del tejido. Una capa de células odontoblastos forma el límite exterior de la pulpa y está asociada con una red subyacente de células dendríticas. Una zona libre de células que está debajo de la capa de odontoblastos es rica en fibras nerviosas y vasos sanguíneos. De manera similar a la dentina, la pulpa dental también se diferencia de la

ectomesénquima derivada de la cresta neural durante el desarrollo de los dientes.

Se han identificado varias fuentes de células madre asociadas con el tejido de la pulpa. En los dientes inmaduros, las papilas apicales, el órgano embrionario responsable de la diferenciación de la pulpa, son la fuente de células madre de las papilas apicales (SCAP). La pulpa dental madura es la fuente de células madre de la pulpa dental (DPSC) mientras que las células madre también son extraídas de dientes de leche exfoliados (SHED). Las células adicionales del núcleo de pulpa dental que funcionan en la defensa pulpar incluyen, pero no están limitadas a, macrófagos, linfocitos y mastocitos. La matriz de pulpa está compuesta de colágenos (por ejemplo, tipos I, III, V y VI), pero carece de mineralización. Otras proteínas no colagenosas de la matriz de pulpa son similares en composición a la dentina. La pulpa dental es capaz de responder al daño de tejido de dentina al secretar nueva dentina de poblaciones viejas de odontoblastos o la generación y secreción de dentina de nuevas poblaciones secundarias de odontoblastos. (Fong y colaboradores, 2005, J. Dent. Educ., 69(5): 555-570).

El periodoncio consiste de tejidos que soportan la corona dental, que incluyen un ligamento periodontal no mineralizado (PDL) interpuesto entre capas de tejidos

mineralizados, que incluyen el cemento, hueso alveolar y dentina. El cemento es una capa mineralizada delgada que cubre la dentina. Los cementoblastos son células responsables de la secreción de matriz de cemento y la mineralización subsecuente. Cuando los cementoblastos quedan atrapados dentro de la matriz de cemento, éstos se denominan cementocitos. Los cementoblastos son ectomesenquimales, se derivan de células de la cresta neural, similares a PDL y hueso alveolar. Al igual que el hueso y la dentina, el cemento es un tejido mineralizado colagenoso que se endurece con la formación de hidroxiapatita carbonatada. (Fong y colaboradores, 2005, J. Dent. Educ., 69(5): 555-570).

El PDL es un espacio entre el cemento y el hueso alveolar. Éste representa un reemplazo de la región de folículos dentales en dientes en desarrollo inmaduros. El PDL maduro contiene principalmente fibroblastos periodontales así como también células madre, conocidos como células madre del ligamento periodontal (PDLSCs). El folículo dental inmaduro también es una fuente de células madre mesenquimales, conocidas como células madre del folículo dental (DFSCs). (Fong y colaboradores, 2005, J. Dent. Educ., 69(5): 555-570).

La Tabla 9 muestra el potencial de diferenciación de células mesenquimales dentales. (Ulmer y colaboradores,

2010, Schweiz Monatsschr Zahnmed, 120:860-872).

Tabla 9. Potencial de Diferenciación de Células Madre Mesenquimales Dentales

	DPSC	SHED	PDLSC	DFSC	SCAP
Adipocitos	X	X	X	X	
Cementoblastos			X	X	
Condrocitos	X		X		
Pulpa dentaria	X				
Dentina	X				
Endotelocitos	X	X			
Musculatura	X				
Neuroblastos				X	
Neuronas	X	X			
Odontoblastos	X	X	X		X
Osteoblastos	X	X	X	X	X
Progenitores de PDL				X	
Periodoncio			X		

Varios marcadores de células madre dentales han sido identificados. Stro-1 y Stro-4 son marcadores de células madre dentales utilizados comúnmente para todas las células madre mesenquimales dentales. Las células madre dentales que se originan de la cresta neural tienen el marcador neuronal, nestina. Un marcador de osteoblastos,

osteocalcina, también se utiliza como un marcador de células madre para DPSCs. Similarmente, las SCAPs expresan Oct-4, Nanog, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 y TRA-1-81. (Ulmer y colaboradores, 2010, Schweiz Monatsschr Zahnmed, 120:860-872).

2.5. Compartimiento de Tejido Facial

Los compartimentos de tejido facial forman una capa de tejido fibroso encontrada por todo el cuerpo rodeando órganos más suaves y más delicados, que incluyen pero no están limitados a músculos, grupos de músculos, vasos sanguíneos, nervios, etcétera. El tejido facial se origina de la mesénquima embriónica. Las facias se forman durante el desarrollo de huesos, músculos y vasos de la capa mesodérmica del embrión. El tejido facial se puede clasificar por categorías en tres tipos dependiendo de la ubicación: (1) tejido facial superficial, el cual se encuentra debajo del tegumento por todo el cuerpo, usualmente combinándose con la capa reticular de la dermis; (2) tejido facial profundo que comprende tejido conectivo fibroareolar denso que rodea músculos, huesos, nervios y vasos sanguíneos; y (3) facia visceral o subserosa, la cual suspende órganos dentro de sus cavidades y los envuelve en capas de membranas de tejido conectivo. (Capítulo IV. Myology, Sección 3. Tendons, Aponeuroses, and Fasciae,

Gray's Anatomy of the Human Body, 20ª Edición, Editada nuevamente por Lewis, W.H., Lea & Febiger, Filadelfia, 1918, Bartleby.com, Nueva York, 2000).

El tejido conectivo fibroareolar de facia comprende cuatro clases de células: (1) células laminares aplanadas, las cuales pueden ser ramificadas o no ramificadas (las células laminares ramificadas contienen citoplasma claro y núcleos ovalados y proyectan procesos multidireccionales que pueden unificarse para formar una red abierta, tal como en la córnea; las células laminares no ramificadas se unen de extremo a extremo. (2) Clasmatocitos, los cuales son células vacuolizadas o granuladas irregulares grandes con núcleos ovalados. (3) Células gránulos, las cuales tienen forma ovoide o esférica. (4) Células plasmáticas de Waldeyer, usualmente esferoides, caracterizadas por un protoplasma vacuolizado.

2.6. Compartimiento de Tejido de Ligamento

El término "ligamentos" como se utiliza en este documento se refiere a tejido conectivo regular denso que comprende fibras colaginosas atenuadas que conectan huesos a articulaciones. La ECM de ligamento está compuesta de colágenos tipo I y tipo III junto con otros proteoglicanos y glicoproteínas. Las células madre mesenquimales han sido descubierta en el ligamento cruzado anterior de humano que

exhibe un potencial de diferenciación multilinaje, como células madre mesenquimales derivadas del hueso. (Cheng y colaboradores, 2010, Tissue Engg. A, 16(7):2237-2253).

2.7. Compartimiento de Tejido Sinovial

La membrana sinovial está compuesta de tejido conectivo fibroso y reviste la cavidad de articulaciones sinoviales. Está hecha de una capa de sinoviocitos similares a macrófagos (tipo A) y similares a fibroblastos (tipo B) y un tejido sub-revestimiento suelto. El fluido sinovial es secretado por las células sinoviales que revisten la membrana sinovial en la cápsula de la articulación. Es un fluido mucoalbuminoso, viscoso, rico en ácido hialurónico. Éste actúa como un fluido lubricante, facilitando el deslizamiento suave de la superficie articular. Los nichos de células madre mesenquimales funcionales han sido identificados como residentes para el revestimiento sinovial y el tejido subsinovial. Estas células son positivas para el nucleósido artificial, yododesoxiuridina (IdU) así como también marcadores de MSC tales como PDGFRα, p75 y CD44 y tienen potencial condrogénico. (Kurth y colaboradores, Arthritis Rheum., 2011, 63(5): 1289-1300). Las MSCs derivadas de fluido sinovial también han sido identificadas y éstas tienen un potencial condrogénico más alto en comparación con las MSCs

derivadas de la médula ósea y adipogénicas. (Koga y colaboradores, 2008, Cell Tissue Res., 333: 207-215). Se ha mostrado que las MSCs y MPCs sinoviales previenen la degeneración debida a la enfermedad de disco intervertebrales (IVD) y que son útiles para el diseño de tejido de cartílago. (Miyamoto y colaboradores, 2010, Arthritis Res. Ther., 12: R206-218; Lee y colaboradores, 2010, Tissue Engg. A, 16(1): 317-325).

2.8. Compartimiento de Tejido de Tendón

Los tendones son compartimentos de tejido conectivo especializados que conectan el hueso al músculo. Las células de tendones se incorporan entre un grupo paralelo de fibras de colágeno que secretan una ECM única que contiene colágenos, proteoglicanos grandes y proteoglicanos ricos en leucina pequeños que funcionan como lubricantes y organizadores del ensamblaje de fibrillas de colágeno. Un nicho único de células madre/células progenitoras de tendones (TSPC) ha sido identificado entre las fibrillas de colágeno paralelas rodeadas por ECM. Las TSPCs exhiben potencial osteogénico y adipogénico. El biglicano y la fibromodulina son componentes clave de ECM de tendones que dirigen el destino de las TSPC a través de la señalización de BMP. Estas TSPCs son positivas para marcadores de células madre derivados de la médula ósea

tales como Stro-1, CD146, CD90 y CD44 pero no para CD18. Las TSPCs no expresan marcadores hematopoyéticos, tales como CD34, CD45 y CD117, o el marcador endotelial CD106. (Bi y colaboradores, 2007, Nat. Med., 13(10): 1219-1227).

2.9. Compartimiento de Tejido de Vasculatura

La pared vascular está hecha de tres zonas concéntricas con una composición celular distinta, todas de origen mesodérmico: la túnica íntima, que contiene células endoteliales diferenciadas predominantemente maduras (EC), la túnica media, que contiene células de músculo liso maduras y diferenciadas y la túnica adventicia, que contiene fibroblastos maduros. (Tilki y colaboradores, 2009, Trends Mol. Med. 15(11): 501-509). Las células progenitoras endoteliales (EPCs), que significa células que exhiben la expresión clonal, características de pluripotencia, adherencia a moléculas de matriz y una capacidad de diferenciarse en células endoteliales (ECs) han sido implicadas en la formación de nuevos vasos sanguíneos a través de la angiogénesis y la vasculogénesis posnatal. Las EPCs tienen muchos marcadores de la superficie celular característicos que incluyen, pero no están limitados a, CD34, AC133, KDR (VEGFR-2), Tie-2 y el ligando para lectina UEA-1. (Tilki y colaboradores, 2009, Trends Mol. Med. 15(11): 501-509; Melero-Martin y Dudley,

2011, Stem Cells, 29: 163-168; Pascilli y colaboradores, 2008, Exp. Cell Res., 315: 901-914).

Los nichos de EPC han sido identificados en la matriz de la médula ósea, sangre periférica del cordón umbilical y la pared vascular. Las EPCs derivadas de la médula ósea y de sangre del cordón umbilical pueden ser esencialmente células progenitoras hematopoyéticas proangiogénicas (HPCs), que circulan en la sangre y se comprometen para linaje mieloide. (Tilki y colaboradores, 2009, Trends Mol. Med. 15(11): 501-509). Las células madre de la pared vascular y las células progenitoras (VW-EPCs) residen en distintas zonas de la pared de los vasos dentro del espacio subendotelial, conocido como la zona avasculogénica, dentro de la adventicia vascular, que forman nichos específicos para paredes vasculares. También se ha descubierto que las paredes de vasos sanguíneos arteriales y venosos de fetos y adultos hospedan nichos residentes para una variedad de células madre y progenitoras, tales como EPCs, progenitores de músculo liso, HSCs, MSCs, células mesangiales que coexpresan marcadores miogénicos y endoteliales, células madre neurales (NSCs), etcétera. (Tilki y colaboradores, 2009, Trends Mol. Med. 15(11): 501-509). Las VW-EPCs son CD34(+)VEGFR-2(+)Tie-2(+)CD31(-)CD144(-). Las VW-EPCs proliferantes y diferenciadoras de vuelven CD144(+).

Durante la embriogénesis, existe evidencia de la existencia de un hemangioblasto (que da origen a células endoteliales y hematopoyéticas) y endotelio hemogénico, que se origina de precursores residentes en la pared vascular. Sin embargo, no se sabe si la VW adulta también contiene hemangioblastos progenitores ancestrales que dan origen tanto a VW-EPCs así como también VW-HSCs. La pared vascular también contiene células similares a pericitos residentes en los espacios subendoteliales. Estas células similares a pericitos sirven como un depósito celular para VW-MSCs, las cuales pueden diferenciarse en colonias con marcadores adipogénicos, osteogénicos y condrogénicos. (Tilki y colaboradores, 2009, Trends Mol. Med. 15(11): 501-509).

3. Células del Compartimiento de Tejido Epitelial

3.1. Matriz de Tejido Placentario

La placenta se considera una de las fuentes más importantes de células madre, y ha sido estudiada extensivamente. Ésta cumple con dos aspiraciones principales de la terapia celular: una fuente de un número tan alto como sea posible de células y el uso de métodos no invasivos para su recolección. Su alta tolerancia inmunológica soporta su uso como una fuente adecuada de terapia celular (Mihu, C. y colaboradores, 2008, Romanian Journal of Morphology and Embryology, 2008, 49(4):441-446).

Los anexos fetales están compuestos de la placenta, membranas fetales y cordón umbilical. El término placenta es de forma discoide con un diámetro de 15-20 cm y un espesor de 2-3 cm. Las membranas fetales, amnios y corion, las cuales encierran el feto en la cavidad amniótica, y la decidua endometrial se extienden desde los márgenes del disco coriónico. La placa coriónica es una estructura de múltiples capas que está orientada hacia la cavidad amniótica. Ésta consiste de dos estructuras diferentes: la membrana amniótica (compuesta de epitelio, una capa compacta, mesodermo amniótico y una capa esponjosa) y el corion (compuesto de mesénquima y una región de células trofoblastos proliferativas extravellosas interpuestas en cantidades variantes de fibrinoide de Langhans, ya sea cubiertas o no por sincitiotrofoblasto).

Los vellos se originan de la placa coriónica y anclan la placenta a través del trofoblasto de la placa basal y el endometrio materno. Del lado maternal, las protrusiones de la placa basal dentro de los vellos coriónicos producen el septo placentario, el cual divide la parénquima en cotiledones irregulares (Parolini, O. y colaboradores, 2008, Stem Cell, 2008, 26:300-311).

Algunos vellos anclan la placenta a la placa basal, mientras que otros terminan libremente en el espacio intervelloso. Los vellos coriónicos presentan diferentes

funciones y estructuras. En la placenta terminal, los vellos troncales muestran un núcleo interior de vasos fetales con una pared muscular distinta y tejido conectivo que consiste de fibroblastos, miofibroblastos y macrófagos de tejido dispersados (células de Hofbauer). Los vellos intermedios maduros y los vellos terminales están compuestos de vasos capilares y mesénquima delgada. Una membrana basal separa el núcleo estromal de una capa multinucleada no interrumpida, llamada el sincitiotrofoblasto. Entre el sincitiotrofoblasto y su membrana basal se encuentran células citotrofoblásticas de Langhans individuales o agregadas, llamadas comúnmente células citotrofoblastos (Parolini, O. y colaboradores, 2008, Stem Cell, 2008, 26:300-311).

Se pueden distinguir cuatro regiones de la placenta fetal: una región epitelial amniótica, una región mesenquimal amniótica, una región mesenquimal coriónica y una región trofoblástica coriónica.

Membrana Amniótica

Las membranas fetales continúan desde el borde de la placenta y encierran el fluido amniótico y el feto. El amnios es una membrana avascular, delgada que está compuesta de una capa epitelial interior y una capa exterior de tejido conectivo que, y es contigua, sobre el

cordón umbilical, con la piel fetal. El epitelio amniótico (AE) es una capa individual no interrumpida de células epiteliales planas, cuboidales y columnares en contacto con fluido amniótico. Éste está unido a una lámina basal distinta que, a su vez, está conectada al mesodermo amniótico (AM). En el mesodermo amniótico más cerca del epitelio, una capa compacta acelular es distinguible, compuesta de colágenos I y III y fibronectina. Más profundo en el AM, se observa una red de células mesenquimales similares a fibroblastos dispersadas y macrófagos raros. Se ha reportado que la capa mesenquimal del amnios contiene en realidad dos subfracciones, una que tiene un fenotipo mesenquimal, también conocido como células estromales mesenquimales amnióticas, y la segunda que contiene células similares a monocitos.

Membrana Coriónica

Una capa esponjosa de fibras de colágeno dispuestas de manera holgada separa el mesodermo amniótico del mesodermo coriónico. La membrana coriónica (corion liso) consiste de regiones mesodérmicas y trofoblásticas. El mesodermo coriónico y el mesodermo amniótico son similares en su composición. Una lámina basal grande e incompleta separa el mesodermo coriónico de las células trofoblastos extravellosas. Estas últimas, similares a

células trofoblastos presentes en la placa basal, se dispersan dentro de la capa fibrinoide y expresan marcadores inmunohistoquímicos de proliferación. La capa fibrinoide de Langhans incrementa usualmente durante el embarazo y está compuesta de dos tipos diferentes de fibrinoide: un tipo de matriz en el lado interior (más compacto) y un tipo de fibrina en el lado exterior (más reticulado). En el borde de la placenta y en la placa basal, el trofoblasto se entrelaza extensivamente con los decedentes (Cunningham, F. y colaboradores, The placenta and fetal membranes, Williams Obstetrics, 20ª edición Appleton and Lange, 1997, 95-125; Benirschke, K. and Kaufmann, P. Pathology of the human placenta. Nueva York, Springer-Verlag, 2000, 42-46, 116, 281-297).

Células Madre Derivadas del Amnios

La membrana amniótica misma contiene células multipotentes que son capaces de diferenciarse en las diversas capas. Los estudios han reportado su potencial en células neurales y gliales, la reparación cardíaca y también células hepatocitos. Los estudios han mostrado que las células epiteliales amnióticas de humano expresan marcadores de células madre y tienen la capacidad de diferenciarse hacia las tres capas germinales. Estas propiedades, la facilidad de aislamiento de las células y

la disponibilidad de la placenta, hacen que la membrana amniótica sea una fuente útil y nada polémica de células para el trasplante y la medicina regenerativa.

Las células epiteliales amnióticas se pueden aislar de la membrana amniótica por medio de varios métodos que son conocidos en el campo. De acuerdo con un método de este tipo, la membrana amniótica se quita del corion subyacente y se digiere con tripsina u otras enzimas digestivas. Las células aisladas se unen fácilmente a cajas de cultivo revestidas con plástico o membrana basal. El cultivo se establece comúnmente en un medio simple tal como el Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) complementado con 5%-10% de suero y factor de crecimiento epidérmico (EGF), en el cual las células proliferan de manera consistente y exhiben una morfología epitelial cuboidal típica. Normalmente, 2-6 pasajes son posibles antes de que cese la proliferación. Las células epiteliales amnióticas no proliferan bien en bajas densidades.

La membrana amniótica contiene células epiteliales con diferentes marcadores de la superficie, lo que sugiere alguna heterogeneidad de fenotipo. Inmediatamente después del aislamiento, las células epiteliales amnióticas de humano expresan niveles muy bajos del antígeno de leucocito humano (HLA)-A, B, C; sin embargo, por medio del pasaje 2, se observan niveles

significativos. Los antígenos de la superficie celular adicionales en las células epiteliales amnióticas de humano incluyen, pero no están limitados a, el transportador de casete de unión a ATP G2 (ABCG2/BCRP), CD9, CD24, E-cadherina, integrinas α6 y β1, c-met (receptor del factor de crecimiento de hepatocitos), antígenos embriónicos específicos para etapas (SSEAs) 3 y 4, y antígenos de rechazo tumoral 1-60 y 1-81. Los marcadores de la superficie que se piensa que están ausentes en las células epiteliales amnióticas de humano incluyen SSEA-1, CD34 y CD133, mientras que otros marcadores, tales como CD117 (c-kit) y CCR4 (receptor de quimiocina CC), son ya sea negativos o pueden ser expresados en algunas células a niveles muy bajos. Aunque los aislados de células iniciales expresan niveles muy bajos de CD90 (Thy-1), la expresión de este antígeno incrementa rápidamente en el cultivo (Miki, T. y colaboradores, Stem Cells, 2005, 23: 1549-1559; Miki, T. y colaboradores, Stem Cells, 2006, 2: 133-142).

Además de los marcadores de la superficie, las células epiteliales amnióticas de humano expresan marcadores moleculares de células madre pluripotentes, que incluyen la proteína de unión a octámeros 4 (OCT 4), gen de la caja de HMG relacionado con SRY 2 (SOX-2) y Nanog (Miki, T. y colaboradores, Stem Cells, 2005, 23: 1549-1559). Los estudios previos también han mostrado que las células de

amnios de humano en agregados quiméricos, xenogénicos, los cuales contienen células madre embriónicas de ratón, se pueden diferenciar en las tres capas germinales y que las células epiteliales amnióticas de humano cultivadas expresan marcadores neuronales y gliales, y pueden sintetizar y liberar acetilcolina, catecolaminas y dopamina. La diferenciación hepática de células epiteliales amnióticas de humano también ha sido reportada. Los estudios han reportado que las células epiteliales amnióticas de humano cultivadas producen albúmina y α-fetroproteína y que las células similares a hepatocitos positivas para albúmina y α-fetroproteína se podrían identificar integradas en parénquima hepática después del trasplante de células epiteliales amnióticas de humano en los hígados de ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID). El potencial hepático de células epiteliales amnióticas de humano se confirmó y se extendió, por lo cual además de la producción de albúmina y α-fetroproteína, se demostraron otras funciones hepáticas, tales como almacenamiento de glicogen y expresión de factores de transcripción enriquecidos en el hígado, tales como factor nuclear de hepatocitos (HNF) 3γ y HNF4α, proteína de unión a CCAAT/intensificador (CEBP α y β), y varios de los genes metabolizadores de fármacos (citocromo P450). La amplia variedad de genes y funciones hepáticos identificados en

células epiteliales amnióticas de humano ha sugerido que estas células pueden ser útiles para la terapia celular dirigida al hígado (Parolini, O. y colaboradores, 2008, Stem Cell, 2008, 26:300-311).

La diferenciación de células epiteliales amnióticas de humano a otro tejido endodérmico, páncreas, también se ha reportado. Por ejemplo, se mostró que las células epiteliales amnióticas de humano cultivadas durante 2-4 semanas en presencia de nicotinamida para inducir la diferenciación pancreática, expresaron insulina. El trasplante subsecuente de células epiteliales amnióticas de humano que expresaban insulina corrigió la hiperglicemia de ratones diabéticos inducidos por estreptozotocina. En el mismo entorno, las células estromales mesenquimales amnióticas de humano no fueron efectivas, lo que sugiere que las células epiteliales amnióticas de humano, pero no las células estromales mesenquimales amnióticas de humano, fueron capaces de adquirir el destino de células β (Parolini, O. y colaboradores, 2008, Stem Cell, 2008, 26:300-311).

Células Estromales Mesenquimales de Amnios y Corion: hAMSC y hCMSC

Se piensa que las células mesenquimales amnióticas de humano (hAMSC) y las células mesenquimales

coriónicas de humano (hCMSC) se derivan del mesodermo extraembriónico. Las hAMSC y las hCMSC se pueden aislar del mesodermo del primer trimestre, el segundo trimestre y el tercer trimestre del amnios y el corion, respectivamente. Para las hAMSC, los aislamientos se realizan usualmente con el amnios terminal disectado de la parte desviada de las membranas fetales para minimizar la presencia de células maternas. Por ejemplo, las poblaciones de hAMSC homogéneas se pueden obtener por medio de un procedimiento de dos pasos, por lo cual: el tejido de amnios de ratón se trata con tripsina para retirar las hAEC y las células mesenquimales restantes entonces se liberan por medio de la digestión (por ejemplo, con colagenasa o colagenasa y DNasa). El rendimiento del amnios terminal es aproximadamente un 1 millón de hAMSC y 10 veces más hAEC por gramo de tejido (Casey, M. y MacDonald P., Biol Reprod, 1996, 55: 1253-1260).

Las hCMSCs se aíslan del corion del primer trimestre y el tercer trimestre después de la remoción mecánica y enzimática de la capa trofoblástica con dispasa. El tejido mesodérmico coriónico luego se digiere (por ejemplo, con colagenasa o colagenasa más DNasa). Las células mesenquimales también han sido aisladas de vellos fetales coriónicos a través del cultivo de explante, aunque es más probable la contaminación materna (Zhang, X., y

colaboradores, Biochem Biophys Res Commun, 2006, 340: 944-952; Soncini, M. y colaboradores, J Tissue Eng Regen Med, 2007, 1:296-305; Zhang y colaboradores, Biochem Biophys Res Commun, 2006, 351: 853-859).

El perfil de marcadores de la superficie de hAMSC y hCMSC cultivadas, y las células estromales mesenquimales (MSC) de médula ósea de adulto son similares. Todas expresan marcadores mesenquimales típicos (Tabla 7) pero son negativas para marcadores hematopoyéticos (CD34 y CD45) y monocíticos (CD14). La expresión en la superficie de SSEA-3 y SSEA-4 y ARN para OCT-4 se ha reportado (Wei J. y colaboradores, Cell Transplant, 2003, 12: 545-552; Wolbank, S. y colaboradores, Tissue Eng, 2007, 13: 1173-1183; Alviano, F. y colaboradores, BMC Dev Biol, 2007, 7: 11; Zhao, P. y colaboradores, Transplantation, 2005, 79: 528-535). Tanto las hAMSC como las hCMSC del primer trimestre y el tercer trimestre expresan bajos niveles de HLA-A, B, C pero no HLA-DR, lo que indica un estado inmunoprivilegiado (Portmann-Lanz, C. y colaboradores, Am J Obstet Gynecol, 2006, 194: 664-673; Wolbank, S. y colaboradores, Tissue Eng, 2007, 13: 1173-1183).

La Tabla 10 proporciona un perfil de expresión de antígenos de la superficie en los pasajes 2-4 para células madre estromales mesenquimales amnióticas y células madre estromales mesenquimales coriónicas de humano.

Tabla 10. Expresión de antígenos de la superficie específicos para células estromales mesenquimales amnióticas y células estromales mesenquimales coriónicas de humano

Positivo (≥ 95%)	Negativo (≤ 2%)
CD90	CD45
CD73	CD34
CD105	HLA-DR

Tanto las hAMSCs como las hCMSCs se diferencian hacia linajes mesodérmicos "clásicos" (osteogénicos, condrogénicos y adipogénicos) y la diferenciación de hAMSC a las tres capas germinales-ectodermo (neuronal), mesodermo (músculo esquelético, cardiomiocítico y endotelial) y endodermo (pancreático) se reportó (Int'Anker, P. y colaboradores, Stem Cells, 2004, 22: 1338-1345; Portmann-Lanz, C. y colaboradores, Am J Obstet Gynecol, 2006, 194: 664-673; Wolbank, S. y colaboradores, Tissue Eng, 2007, 13: 1173-1183; Soncini, M. y colaboradores, J Tissue Eng Regen Med, 2007, 1:296-305; Alviano, F., BMC Dev Biol, 2007, 7: 11).

Las células amnióticas y coriónicas de humano se injertan exitosa y persistentemente en múltiples órganos y tejidos in vivo. La detección de quimerismo humano en el cerebro, pulmones, médula ósea, timo, vaso, riñón e hígado

después del trasplante ya sea intraperitoneal o intravenoso de células de amnios y corion de humano en cerdos y ratas neonatales fue indicativa en realidad de una migración activa consistente con la expresión de moléculas de adhesión y migración (L-selectina, VLA-5, CD29 y ligando de P-selectina 1), así como también la proteinasa de matriz celular (MMP-2 y MMP-9) (Bailo, M. y colaboradores, Transplantation, 2004, 78:1439-1448).

Cordón Umbilical

Dos tipos de células madre umbilicales se pueden encontrar, específicamente las células madre hematopoyéticas (UC-HS) y las células madre mesenquimales, las cuales a su vez se pueden encontrar en la sangre del cordón umbilical (UC-MS) o en la gelatina de Wharton (UC-MM). La sangre del cordón umbilical ha estado durante mucho tiempo en el centro de la atención de investigadores como una fuente importante de células madre para el trasplante, por varias razones: (1) contiene un número más alto de células madre hematopoyéticas primitivas (HSC) por unidad de volumen, las cuales proliferan más rápidamente, que la médula ósea; (2) existe un riesgo más bajo de rechazo después del trasplante; (3) el trasplante no requiere una coincidencia de antígenos de HLA perfecta (a diferencia del caso de la médula ósea); (4) la sangre de UC ya ha sido

utilizada exitosamente en el tratamiento de errores metabólicos congénitos; y (5) no hay necesidad de una nueva tecnología para la recolección y el almacenamiento de células mononucleares de sangre de UC, puesto que estos métodos están establecidos desde hace mucho tiempo.

Los vasos del cordón umbilical (UC) y la mesénquima circundante (incluyendo el tejido conectivo conocido como gelatina de Wharton) se derivan de la mesodermis embriónica y/o extraembriónica. De esta manera, estos tejidos, así como también las células germinales primitivas, se diferencian del epiblasto próximo, al momento de la formación de la línea primitiva del embrión, que contiene MSC e incluso algunas células con potencial pluripotente. Se especula que el material de matriz de UC se deriva de una mesénquima primitiva, la cual se encuentra en un estado de transición hacia la mesénquima de la médula ósea de adulto (Mihu, C. y colaboradores, 2008, Romanian Journal of Morphology and Embryology, 2008, 49(4):441-446).

La sangre de la placenta y el cordón umbilical es relativamente fácil de recolectar en bolsas de donación de sangre usuales, las cuales contienen sustancias anticoagulantes. Las células mononucleares se separan por medio de la centrifugación en un gradiente de Ficoll, de las cuales se separarán las dos poblaciones de células madre: (1) células madre hematopoyéticas (HSC), las cuales

expresan ciertos marcadores característicos (CD34, CD133); y (2) células madre mesenquimales (MSC) que se adhieren a la superficie de cultivo bajo ciertas condiciones (por ejemplo, medio de McCoy modificado y revestimiento de vasos con Suero Bovino Fetal (FBS) o Suero Fetal Bovino (FCS)). (Munn, D. y colaboradores, Science, 1998, 281: 1191-1193; Munn, D. y colaboradores, J Exp Med, 1999, 189: 1363-1372). Las MSCs de sangre de cordón umbilical (CU-MS) pueden producir citocinas, las cuales facilitan el injerto en el donador y la supervivencia de HSC in vitro en comparación con las MSC de médula ósea. (Zhang, X y colaboradores, Biochem Biophys Res Commun, 2006, 351: 853-859).

Las MSCs de la matriz de cordón umbilical (UC-MM) se obtienen por medio de diferentes métodos de cultivo dependiendo de la fuente de células, por ejemplo, MSCs de la matriz conectiva, de células subendoteliales de la vena umbilical o incluso de un explante de cordón umbilical completo. Éstas se cultivan generalmente bien en medio DMEM, complementado con varios factores nutricionales y de crecimiento; en ciertos casos el tratamiento previo de los vasos con ácido hialurónico ha resultado ser benéfico (Baban, B. y colaboradores, J Reprod Immunol, 2004, 61: 67-77).

3.2. Pulmón

Los pulmones, los cuales son órganos pareados que

llenan la cavidad torácica, constituyen un mecanismo de intercambio gaseoso de aire-sangre eficiente, realizado por el pasaje de aire de la boca o nariz, secuencialmente a través de la orofaringe, nasofaringe, laringe, tráquea y finalmente a través de un sistema de subdivisión progresiva de bronquios y bronquiolos hasta que alcanza finalmente los alvéolos donde el intercambio gaseoso de aire-sangre tiene lugar. Un nicho residente con células madre multipotentes características con perfiles de superficie positivos para c-kit ha sido identificado recientemente localizado en alvéolos de bronquiolos pequeños. Estas células madre expresan los factores de transcripción, Nanog, Oct3/4, Sox2 y Klf4, que gobiernan la pluripotencia en células madre embriónicas. (Kajstura, J. y colaboradores, 2011, New Engl. J. Med., 364(19):1795-1806)).

3.3. Mamario

La glándula mamaria es un órgano epitelial de dos capas sensible a hormonas que comprende una capa epitelial luminal interior y una capa mioepitelial exterior rodeada por una membrana basal en una almohadilla plana estromal. Las células madre mamarias con potencial mioepitelial han sido identificadas en sus nichos en los conductos terminales de la glándula mamaria. (LaBarge, 2007, Stem Cell Rev., 3(2): 137-146).

3.4. Piel

La piel funciona como una barrera primaria que confiere protección de ataques ambientales. La piel está compuesta de una epidermis exterior y una dermis interior separadas por una membrana basal (BM), rica en ECM y factores de crecimiento. La BM de la unión epidérmica-dérmica está compuesta de colágenos (por ejemplo, tipo IV y XVII), lamininas, nidogeno, fibronectina y proteoglicanos que proporcionan sitios de almacenamiento para factores de crecimiento y nutrientes que sostienen la proliferación y adhesión de queratinocitos epidérmicos.

La epidermis es un tejido epitelial sólido que comprende queratinocitos que están vinculados entre sí por vía de uniones celulares, tales como desmosomas. Los queratinocitos se organizan en distintas capas, que comprenden el estrato córneo, estrato granuloso, estrato espinoso y estrato basal. La matriz epidérmica está constituida de hialuronano y otros proteoglicanos, que incluyen pero no están limitados a, desmosealina, glicipanos, versicano, perlecano y sindecanos. (Sandjeu y Haftek, 2009, J. Physiol. Pharmacol. 60 (S4): 23-30). Los desmosomas epidérmicos son complejos multiméricos de glicoproteína transmembrana y proteínas citosólicas con el citoesqueleto de queratina. Las proteínas desmosales de la epidermis pertenecen predominantemente a las familias de

cadherina, ***Armadillo*** y plaquina.

La dermis subyacente es un tejido conectivo que está comprendido principalmente de fibroblastos con células inflamatorias ocasionales. Incorporados dentro de la dermis también están los apéndices epidérmicos, tales como folículos pilares y glándulas sebáceas, así como también nervios y vasculatura cutánea. La ECM dérmica está hecha esencialmente de colágenos tipo I, III y V y elastina junto con componentes no colagenosos tales como glicoproteínas, proteoglicanos, GAGs, citocinas y factores de crecimiento. Los colágenos dérmicos ayudan a mediar las interacciones de fibroblastos-matriz a través de una variedad de receptores de la superficie celular y proteoglicanos, tales como β1-integrinas. (Hodde y Johnson, 2007, Am. J. Clin. Dermatol. 8(2): 61-66).

Durante el desarrollo embriónico, la epidermis se origina del ectodermo, mientras que la dermis se diferencia del mesodermo. Después de la gastrulación, conforme las células madre mesenquimales de origen mesodérmico poblan la piel, éstas envían señales a la capa epidérmica individual para el inicio de la estratificación epidérmica y dirigen la colocación de crecimientos hacia afuera de apéndices epidérmicos, tales como los folículos pilosos y glándulas sebáceas. Junto con la mesénquima, la capa basal de la epidermis se organiza en una membrana basal que es rica en

proteínas de ECM y factores de crecimiento. Una variedad de diferentes vías de señalización han sido implicadas en la morfogénesis de la piel, que incluyen pero no están limitadas a Notch, Wnt, proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), factor nuclear-kB (NF-kB), regulador de transcripción, p63, la familia de AP2 de factores de transcripción, reguladores de transcripción de la proteína de unión de CCAAT/intensificador (C/EBP), interferón regulador 6 (URF6), grainyhead-similar 3 (GRHL3) y factor similar a Kruppel (KLF4). (Blanpain y Fuchs, 2009, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 10(3): 207-217).

La piel adulta experimenta una renovación celular constante por lo cual las células muertas de la piel son liberadas y nuevas células son regeneradas y reemplazadas, por medio de un proceso conocido como homeostasis de la piel. Varios nichos de células madre con distintos perfiles de marcadores de la superficie y potenciales de diferenciación han sido identificados. Éstos incluyen, pero no están limitados a, células madre epidérmicas de epidermis interfolicular, células madre de abultamiento y células madre epiteliales del folículo piloso, células madre dérmicas (por ejemplo, células dérmicas multipotentes, células progenitoras derivadas de la piel, células madre multipotentes derivadas de la dermis y fibrocitos), células madre de papilas dérmicas y células

madre de glándulas sebáceas. Colectivamente, estos nichos de células madre de la piel toman parte en el mantenimiento de la homeostasis de la piel con la ayuda de factores de crecimiento y citocinas. (Zouboulis y colaboradores, 2008, Exp. Gerontol. 43: 986-997; Blanpain, 2010, Nature, 464: 686-687).

4. Células del Compartimento de Tejido Muscular

Los compartimentos de tejido muscular están comprendidos de tejido muscular contráctil. Estos pueden ser de tres clases: músculo esquelético asociado con el sistema esquelético; músculo cardíaco asociado con el corazón; y músculo liso asociado con la vasculatura y el tracto gastrointestinal. Las fibras de tejido de músculo esquelético son estriadas y son de función voluntaria. Las fibras de músculo cardíaco tienen discos intercalados característicos y son de función involuntaria. El tejido de músculo liso está comprendido de células en forma de husillo y es de función involuntaria.

Los músculos esqueléticos están compuestos de una población de células precursoras miogénicas inactivas conocidas como células satélite con propiedades de regeneración y auto-renovación de músculos, así como también una población de células madre derivadas de músculo multipotentes (MDSC) con potencial de diferenciación

multilinaje, tales como linajes mesodérmicos que incluyen, pero no están limitados a, linajes miogénicos, linajes adipogénicos, linajes osteogénicos, linajes condrogénicos, linajes endoteliales y hematopoyéticos, y linajes ectodérmicos, que incluyen pero no están limitados a células similares a neuronas. (Xu y colaboradores, 2010, Cell Tissue Res., 340: 549-567).

Las células satélite de músculo esquelético son células mononucleadas inactivas que son residentes en la membrana de fibras musculares, debajo de la lámina basal que forma distintos nichos de células madre. De manera similar a otros nichos de células madre, el nicho de células satélite de músculo esquelético es una estructura dinámica, capaz de alternar entre estados inactivos (estáticos) y activados en respuesta a señales externas. Una vez activadas, las células satélite tienen el potencial de proliferar, expandirse y diferenciarse a lo largo del linaje miogénico. La lámina basal, la cual sirve para separar fibras individuales de músculo esquelético, conocidas como miofibras, y sus nichos asociados de células satélite y células madre, de las células del intersticio, es rica en colágeno tipo IV, perlecan, laminina, entactina, fibronectina y otras diversas glicoproteínas y proteoglicanos, que pueden funcionar como receptores para factores de crecimiento que efectúan su activación por

medio del procesamiento extracelular y modificaciones. Además de estas interacciones proporcionadas por la ECM, las células adyacentes, tales como células endoteliales y células madre multipotentes derivadas de vasos sanguíneos, tales como pericitos y mesoangioblastos, o componentes neuronales, tienen todos el potencial de afectar el microambiente del nicho. (Gopinath y colaboradores, 2008, Aging Cell, 7: 590-598).

Las células madre cardíacas endógenas también han sido identificadas en nichos de células madre cardíacas. (Mazhari y Hare, 2007, Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med., 4(S1):S21-S26).

Las células de músculo liso vasculares se derivan de células madre de cresta neural cardíacas embriónicas, así como también células proepicardíacas y células progenitoras endoteliales. La diferenciación de músculo liso es dependiente de una combinación de factores, que incluyen pero no están limitados a Pax3, Tbx1, FoxC1 y factor de respuesta de suero, que interactúa con componentes microambientales de la ECM, tales como BMPs, Wnts, endotelina (ET)-1 y FGF8. En el adulto, las células de músculo liso vasculares experimentan la degradación, reparación y regeneración constante por medio de esfuerzos concertados de tanto células mesenquimales derivadas de hueso multipotentes así como también células madre de

músculo liso residentes dentro del tejido de músculo liso vascular. (Hirschi y Majesky, 2004, The Anatomical Record, Parte A, 276A: 22-33).

5. Células del Compartimiento de Tejido Neural

Los compartimentos de tejido neural están comprendidos de neuronas y la neuroglía, incorporados con la matriz neural. El tejido neural es de origen ectodérmico, derivado de la placa neural embriónica. El tejido neural está localizado principalmente dentro del cerebro, la médula espinal y los nervios.

Los nichos de células madre neuronales residentes han sido identificados en el cerebro de mamíferos adultos, restringido a la zona subventricular así como también al ventrículo lateral y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo. Los astrocitos, los cuales son células nerviosas en forma de estrella, sirven tanto como células madre neurales así como también células de nichos de soporte que secretan factores de crecimiento esenciales que proporcionan apoyo para la neurogénesis y vasculogénesis. La lámina basal y la vasculogénesis asociada son componentes esenciales del nicho. Los factores moleculares embriónicos y las señales persisten dentro de los nichos de células madre neurales y desempeñan un papel crucial en la neurogénesis. Las células madre neurales tienen marcadores

de VEGFR2, doublecortin y Lex (CD15). Las vías de señalización principales implicadas en la neurogénesis incluyen pero no están limitadas a Notch, Eph/efrinas, Shh y BMPs. (Alvarez-Buylla y Lim, 2004, Neuron, 41: 683-686).

6. Injertos - Injertos y Rechazo de Injertos

Un injerto es un tejido u órgano utilizado para el trasplante a un paciente. Una estrategia común empleada en el diseño de tejidos implica la siembra de ECM natural descelularizada o andamios sintéticos con una variedad de diferentes células madre o progenitoras que son capaces de la regeneración (véase, por ejemplo, Flynn and Woodhouse, 2008, Organogenesis, 4(4): 228-235; Uriel y colaboradores, 2008, Biomaterials, 29: 3712-3719; Flynn, 2010, Biomaterials, 31: 4715-4724; Choi y colaboradores, Tissue Engg. C., 16(3): 387-396; Brown y colaboradores, 2011, Tissue Engg. C., 17(4): 411-421; Cheng y colaboradores, 2009, Tissue Engg. A, 15(2): 231-241; Li y colaboradores, 2011, Biomaterials, doi:10:1016/j.biomaterials.2011.03.008; Butler y colaboradores, 2003, Connective Tissue Research, 44(S1): 171-178); Mercuri y colaboradores, J. Biomed. Mater. Res. A., 96(2): 422-435); Olson y colaboradores, 2011, Chonnam. Med. J. 47:1-13).

Los injertos trasplantados pueden ser rechazados por el hospedante receptor a través de una respuesta inmune

orquestada contra los antígenos de histocompatibilidad expresados por el tejido injertado, los cuales pueden ser vistos por el hospedante receptor como extraños. Los efectores responsables principalmente de estos rechazos incluyen las células auxiliares tipo 1 CD4+, células citotóxicas CD8+ y anticuerpos. Los mecanismos alternativos del rechazo incluyen la implicación de células auxiliares tipo 2 CD4+, células con memoria CD8+ y células que pertenecen al sistema inmune innato, tales como células asesinas naturales, eosinófilos y neutrófilos. Además, la inflamación local asociada con el rechazo es regulada estrictamente al nivel del injerto por células T reguladoras y mastocitos.

Implantes

Los pacientes que sufren de órganos afectados o lesionados pueden ser tratados con un trasplante de órganos. Sin embargo, los métodos actuales de trasplante de órganos se enfrentan con desafíos debidos, en parte a la necesidad de suprimir el rechazo inmune del órgano trasplantado. La mayoría de métodos dependen del uso de fármacos inmunosupresores que están asociados con efectos colaterales no deseados.

Se calcula que más de un millón de pacientes necesitan ser tratados quirúrgicamente por aflicciones

esqueléticas cada año debido a defectos óseos creados durante la cirugía de tumores o causados por traumatismo, anormalidades esqueléticas congénitas, fractura, escoliosis, artrodesis espinal o reemplazo de articulaciones y dientes. Sin embargo, los tratamientos quirúrgicos no siempre son efectivos para resolver estos problemas debido a condiciones locales inadecuadas de los huesos y la curación deteriorada de los huesos. Por ejemplo, las fracturas complicadas pueden no lograr sanar, dando por resultado uniones retardadas (una fractura ósea que está tomando una cantidad de tiempo excepcionalmente prolongada para curarse) o falta de uniones (ausencia de curación en una fractura). Además, el tratamiento de tumores óseos o síndromes congénitos requiere frecuentemente la creación artificial de defectos óseos grandes, los cuales necesitan ser llenados, lo que demanda sustitutos adecuados y biocompatibles para injertos de huesos.

La curación de huesos alrededor de implantes implica la activación de una secuencia de eventos osteogénicos, vasculares e inmunológicos que son similares a aquellos que ocurren durante la curación de huesos. Varios tipos de células, factores de crecimiento y citocinas están involucrados e interactúan por todas las etapas de la osteointegración, inclusive la inflamación,

vascularización, formación de huesos y finalmente la remodelación ósea.

Injertos de Huesos

Los injertos de huesos autólogos frescos para el tratamiento de un defecto óseo o fractura en un paciente se derivan de médula ósea recientemente recolectada de la cresta ilíaca (el borde superior curvado grueso del ilion, el hueso más prominente de la pelvis) y combinada con otros materiales que incluyen substratos osteoconductivos. Las complicaciones asociadas con la recolección autóloga incluyen la morbosidad del sitio donador tan alta como 25%, infección, malformación, dolor y pérdida de función.

Matriz Ósea con Células Madre Mesenquimales

Se han hecho intentos por reparar defectos óseos al implantar una matriz ósea que comprende células madre mesenquimales autólogas o alogénicas (MSCs). Las MSCs se consideran inmunológicamente neutras, lo que significa que las células madre mesenquimales del donador no necesitan ser coincidentes con el tejido para el receptor, lo que permite de esta manera que las MSCs se utilicen de manera efectiva en injertos alogénicos. Además, las MSCs alogénicas expandidas en cultivo han sido implantadas ya sea directamente o se han combinado con una matriz, tal

como una matriz basada en gelatina o basada en colágeno, o una matriz ósea, con el propósito de soportar la diferenciación de las MSCs in vivo.

En otros casos, las MSCs han sido combinadas con una matriz ósea de la cual la médula ósea ha sido retirada con el propósito de retirar células indeseables, y la matriz luego es sembrada con MSCs expandidas en cultivo. Estas composiciones luego son crioconservadas bajo procedimientos de crioconservación estándar para el uso posterior. Sin embargo, este método no es ideal por varias razones. En primer lugar, debido a que las MSCs han sido retiradas del nicho de células madre original y han sido sembradas en una nueva matriz ósea, las MSCs en esta composición no se unen bien a la matriz ósea y solamente se suspenden en la solución de crioconservación. Como resultado, se pueden perder muchas células activas durante el proceso de remoción de la solución de crioconservación antes del trasplante en un sujeto. En segundo lugar, puesto que las células no están unidas al nicho de células madre o laguna al cual se unieron originalmente y en el cual se nutrieron, la expansibilidad y el potencial osteogénico de las células pueden ser afectados negativamente por los procedimientos de separación y siembra.

Los materiales de implante derivados de tejido replican la función biológica y mecánica de una matriz

extracelular de origen natural encontrada en tejidos corporales. Estas matrices derivadas de tejidos proporcionan el soporte necesario en el cual las células se pueden adherir, emigrar y expandir y proporcionan el influjo y afluencia de células, tales como células madre y células progenitoras, y otros factores, tales como factores de crecimiento y citocinas, capaces de inducir y soportar el crecimiento y la reparación de tejidos.

GLOSARIO

El término "temperatura ambiente" como se utiliza en este documento se refiere a la temperatura de los alrededores no alterados, inmediatos. La temperatura ambiente es entre aproximadamente 18°C y aproximadamente 28°C. De acuerdo con algunas modalidades, la temperatura ambiente es la temperatura ambiental.

El término "adherente" como se utiliza en este documento se refiere al acto de pegar, ceñir o permanecer unido.

El término "adipocina" como se utiliza en este documento se refiere a un factor secretado por el tejido adiposo.

El término "adipocito" como se utiliza en este documento se refiere a un tipo de célula funcional de grasa, o tejido adiposo, que se encuentra por todo el

cuerpo, particularmente bajo la piel. Los adipocitos almacenan y sintetizan grasa (más específicamente, triglicéridos o lípidos) para energía, regulación térmica y acojinamiento contra un choque mecánico. Aunque el linaje de los adipocitos aún no es claro, parece que los MSCs pueden diferenciarse en dos tipos de lipoblastos, uno que da origen a adipocitos blancos y el otro a adipocitos cafés. Ambos tipos de adipocitos almacenan triglicéridos y otros lípidos.

El término "adipogénico" como se utiliza en este documento se refiere a un potencial de células precursoras no diferenciadas para diferenciarse en células formadoras de grasa o adipocomponentes.

El término "célula madre adiposa" o "célula madre derivada de tejido adiposo" (ASC) como se utiliza en este documento se refiere a células madre pluripotentes, MSCs y progenitores adiposos más comprometidos y estroma obtenido de tejido adiposo.

El término "administrar" como se utiliza en este documento significa proporcionar o aplicar.

El término "alogénico" como se utiliza en este documento se refiere a ser genéticamente diferente aunque se pertenece a o se obtiene de la misma especie.

El término "células madre amnióticas" como se utiliza en este documento se refiere a células madre

pluripotentes, células madre multipotentes y células progenitoras derivadas de la membrana amniótica, las cuales pueden dar origen a un número limitado de tipos de células in vitro y/o in vivo bajo una condición apropiada e incluye expresamente tanto células epiteliales amnióticas como células estromales amnióticas.

El término "unido" como se utiliza en este documento se refiere a ser sujetado, fijado, empalmado, conectado, atado, adherido a o ensamblado con.

El término "autólogo" como se utiliza en este documento significa derivado del mismo organismo.

El término "injerto autólogo" o "autoinjerto" como se utiliza en este documento se refiere a un tejido que se injerta en una nueva posición en o sobre el cuerpo del mismo individuo.

El término "factor de crecimiento de fibroblastos básico" (bFGF, FGF2) como se utiliza en este documento se refiere a un efector multifuncional para muchas células de origen mesenquimal y neuroectodérmico que es un potente inductor de la neovascularización y la angiogénesis.

El término "biocompatible" como se utiliza en este documento se refiere a no causar una irritación clínicamente relevante al tejido, lesión, reacción tóxica o reacción inmunológica a un tejido vivo.

El término "biomarcadores" (o "biofirmas") como

se utiliza en este documento se refiere a péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, anticuerpos, genes, metabolitos o cualquier otra sustancia utilizada como indicadores de un estado biológico. Éste es una característica que se mide objetivamente y se evalúa como un indicador celular o molecular de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica.

El término "hueso" como se utiliza en este documento se refiere a un tejido conectivo duro que consiste de células incorporadas en una matriz de una sustancia molida mineralizada y fibras de colágeno. Las fibras se impregnan con una forma de fosfato de calcio similar a hidroxiapatita así como también con cantidades sustanciales de carbonato, citrato y magnesio. El hueso consiste de una capa exterior densa de sustancia compacta o sustancia cortical cubierta por el periostio y una sustancia esponjosa, suelta interior; la porción central de un hueso largo está llena con médula.

Los términos "hueso poroso" o "hueso trabecular" como se utilizan en este documento se refieren al hueso esponjoso encontrado en las partes interiores de hueso compacto en el cual la matriz forma un retículo de placas y varillas grandes conocidas como las trabéculas, las cuales se someten a la anastomosis para formar un enrejado. Este

enrejado encierra parcialmente muchos espacios de intercomunicación rellenos con médula ósea. Los espacios medulares son relativamente grandes y están dispuestos de manera irregular y la sustancia ósea está en la forma de trabéculas de anastomosis delgadas y espículos picudos.

Los términos "hueso cortical" o "hueso compacto" como se utilizan en este documento se refieren a la capa exterior densa de hueso que consiste en gran medida de osteones laminares concéntricos y laminillas intersticiales. Los espacios o canales son estrechos y la sustancia ósea está empacada densamente.

El término "proteína morfogenética ósea (BMP) como se utiliza en este documento se refiere a un grupo de citocinas que son parte de la familia del factor de crecimiento transformante-β (TGF-β). Los ligandos de BMP se unen a un complejo del receptor de BMP tipo II y un receptor de BMP tipo I (Ia o Ib). Esto conduce a la fosforilación del receptor tipo I que fosforila subsecuentemente los Smads específicos para BMP (Smad1, Smad5 y Smad8), lo que permite que estos Smads asociados con receptores formen un complejo con el Smad4 y se muden dentro del núcleo donde el complejo de Smad se une a la proteína de unión al ADN y actúa como un intensificador de transcripción. Las BMPs tienen un papel significativo en la formación de huesos y cartílagos in vivo. Se ha reportado

que la mayoría de BMPs son capaces de estimular la osteogénesis en osteoblastos maduros, mientras que las BMP-2, 6 y 9 pueden desempeñar un papel importante en la inducción de la diferenciación de osteoblastos de células madre mesenquimales Cheng, H. y colaboradores, J. Bone & Joint Surgery 85: 1544-52 (2003).

El término "unido" o cualquiera de sus formas gramaticales utilizadas en ese documento se refiere a la capacidad para mantener sobre, en contacto, interactuar con o combinarse con.

El término "amortiguador" o "solución amortiguadora" como se utiliza en este documento se refiere a un compuesto, usualmente una sal, el cual, cuando se disuelve en un medio acuoso, sirve para mantener la concentración de iones de hidrógeno libres de la solución dentro de un cierto intervalo de pH cuando los iones de hidrógeno se agregan o se retiran de la solución. Se dice que una sal o solución tiene una "capacidad amortiguadora" o amortigua la solución sobre este intervalo, cuando proporciona esta función. Generalmente un amortiguador tendrá una capacidad de amortiguamiento adecuada sobre un intervalo que está dentro de .±. 1 unidad de pH de su pK.

El término "solución isotónica amortiguada" como se utiliza en este documento se refiere a cualquier amortiguador que se utilice comúnmente en la investigación

biológica. Las soluciones isotónicas amortiguadas ejemplares incluyen pero no están limitadas a la solución salina balanceada (BSS), Solución Salina Balanceada de Hank, Solución Salina Balanceada de Gey, Solución Salina Amortiguada de Hank, Solución Salina Amortiguada de Fosfato, Solución Salina Amortiguada con Tris, etcétera. El término "solución isotónica" como se utiliza en este documento se refiere a una solución cuya osmolaridad y concentraciones de iones coinciden estrechamente con aquellas dentro de células normales del cuerpo y la sangre.

El término "portador" como se utiliza en este documento se refiere a un agente o vehículo inerte farmacéuticamente aceptable para suministrar uno o más agentes activos a un sujeto, y es referido frecuentemente como "excipiente". El portador debe ser de una pureza suficientemente alta y de una toxicidad suficientemente baja para volverlo adecuado para la administración al sujeto que es tratado. El portador debe mantener además la estabilidad y la biodisponibilidad de un agente activo.

El término "célula" se utiliza en este documento para referirse a la unidad estructural y funcional de organismos vivos y es la unidad más pequeña de un organismo clasificado como vivo.

El término "quimiocina" como se utiliza en este documento se refiere a una clase de citocinas

quimiotácticas que señalan a los leucocitos para moverse en una dirección específica.

Los términos "quimiotáxis" o "quimiotáctico" se refieren al movimiento dirigido de una célula movible o una parte a lo largo de un gradiente de concentración química hacia condiciones ambientales que considera atractivas y/o lejos de alrededores que encuentra repelentes.

El término "condrocitos" como se utiliza en este documento se refiere a células encontradas en cartílago que producen y mantienen la matriz cartilaginosa para, por ejemplo, articulaciones, canales de orejas, tráquea, epiglotis, laringe, los discos entre vértebras y los extremos de costillas. Desde menos diferenciado hasta terminalmente diferenciado, el linaje condrocítico es (i) Unidad formadora de colonias-fibroblasto (CFU-F); (ii) célula madre mesenquimal/célula estromal medular (MSC); (iii) condrocito.

El término "condrogénesis" como se utiliza en este documento se refiere a la formación de nuevo cartílago a partir de células que forman cartílago o condrocompetentes.

El término "condrogénico" como se utiliza en este documento se refiere a un potencial de células precursoras no diferenciadas para diferenciarse en células formadoras de cartílago o condrocompetentes.

El término “compatible” como se utiliza en este documento significa que los componentes de una composición son capaces de ser combinados entre sí de una manera tal que no exista una interacción que reduciría sustancialmente la eficacia de la composición bajo condiciones de uso ordinarias.

El término “componente” como se utiliza en este documento se refiere a una parte, elemento o ingrediente constituyente.

El término “condición”, como se utiliza en este documento se refiere a una variedad de estados de salud y se pretende que incluya trastornos o enfermedades causados por cualquier mecanismo subyacente o trastorno, lesión y la promoción de tejidos y órganos saludables.

El término “contacto” y sus diversas formas gramaticales como se utiliza en este documento se refiere a un estado o condición de toque o de proximidad inmediata o local. El contacto de una composición con un destino objetivo puede ocurrir por cualquier medio de administración conocido por el artífice experto.

El término “espesor de la sección cortada” como se utiliza en este documento se refiere al espesor de una sección medido directamente desde el dispositivo de seccionamiento (criostato, microtomo, etcétera) antes del procesamiento histológico, el cual puede causar el

encogimiento en el eje z. También se conoce como el avance de bloques del microtomo.

El término "citocina" como se utiliza en este documento se refiere a sustancias de proteínas solubles pequeñas secretadas por células las cuales tienen una variedad de efectos sobre otras células. Las citocinas median muchas funciones fisiológicas importantes que incluyen el crecimiento, desarrollo, curación de heridas y la respuesta inmune. Éstas actúan al unirse a sus receptores específicos para células localizados en la membrana celular, lo cual permite que una cascada de transducción de señales distinta inicie en la célula, lo cual conducirá eventualmente a cambios bioquímicos y fenotípicos en células objetivo. Generalmente, las citocinas actúan localmente. Éstas incluyen citocinas tipo I, las cuales comprenden muchas de las interleucinas, así como también varios factores de crecimiento hematopoyéticos; citocinas tipo II, que incluyen los interferones e interleucina-10; moléculas relacionadas con el factor de necrosis tumoral ("TNF"), que incluyen TNFα y linfotoxina; miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas, que incluyen interleucina 1 ("IL-1"); y las quimiocinas, una familia de moléculas que desempeñan un papel crucial en una amplia variedad de funciones inmunes e inflamatorias. La misma citocina puede tener diferentes

efectos sobre una célula dependiendo del estado de la célula. Las citocinas regulan frecuentemente la expresión de, o activan cascadas de otras citocinas. Los ejemplos no limitantes de citocinas incluyen por ejemplo, IL-1.alfa., IL-.beta., IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12/IL-23 P40, IL13, IL-17, IL-18, TGF-beta., IFN-gamma., GM-CSF, Gro.alfa., MCP-1 y TNF-alfa.

El término "citometría" como se utiliza en este documento se refiere a un proceso en el cual se miden las características físicas y/o químicas de células individuales, o por extensión, de otras partículas biológicas o no biológicas en aproximadamente el mismo tamaño o etapa. En la citometría de flujo, las mediciones se hacen conforme las células o partículas pasan a través del aparato de medición (un citómetro de flujo) en una corriente de fluido. Un clasificador de células, o clasificador de flujo, es un citómetro de flujo que utiliza medios eléctricos y/o mecánicos para desviar y recolectar células (u otras partículas pequeñas) con características medidas que se encuentran dentro de una variedad de valores seleccionados por el usuario.

"Descelularización", como se utiliza en este documento en la totalidad de sus formas gramaticales, es cualquier proceso por medio del cual las células y componentes celulares (inclusive el ADN) son retirados de

un tejido, dejando de ese modo la matriz extracelular (ECM) esencialmente libre de estas células y componentes celulares.

La "deslipidización" y la "deslipidación", como se utilizan en este documento en todas sus formas gramaticales, son cualquier proceso por medio del cual los lípidos son retirados de un tejido y se utilizan de manera intercambiable en este documento.

La "matriz ósea desmineralizada" (DBM) se refiere a un material derivado de huesos que tiene actividad osteoconductiva y osteoinductiva. La DBM se puede preparar por medio de la extracción ácida de hueso de aloinjerto, dando por resultado la pérdida de la mayor parte del componente mineralizado pero la retención de colágeno y proteínas no colagenosas, que incluyen los factores de crecimiento. Los métodos para preparar la matriz ósea desmineralizada a partir de un hueso son conocidos en el campo, como se da a conocer, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,073,373; 5,484,601; y 5,284,655, las cuales se incorporan en este documento a manera de referencia. La DBM se puede preparar a partir de hueso autólogo, hueso alogénico (o "aloinjerto") o hueso xenogénico. La DBM se puede preparar a partir de hueso poroso, hueso cortical o combinaciones de hueso poroso y cortical. Para el propósito de la presente descripción, el

hueso desmineralizado incluye una matriz ósea que tiene un contenido mineral residual de 5% o menos (p/p), 2% o menos (p/p), 1% o menos (p/p), 0.5% o menos (p/p), o que consiste esencialmente de colágeno, proteínas no colagenosas tales como factores de crecimiento, y otras sustancias no minerales encontradas en el hueso original, aunque no necesariamente en sus cantidades originales. El término "hueso cortical desmineralizado" (DCB) como se utiliza en este documento se refiere a un hueso cortical de aloinjerto desmineralizado.

El término "derivado" como se utiliza en este documento significa un compuesto que se puede producir a partir de otro compuesto de estructura similar en uno o más pasos. Un "derivado" o "derivados" de un péptido o un compuesto retiene por lo menos un grado de la función deseada del péptido o compuesto. Por consiguiente, un término alternativo para "derivado" puede ser "derivado funcional". Los derivados pueden incluir modificaciones químicas del péptido, tales como alquilación, acilación, carbamilación, yodación o cualquier modificación que derivatice el péptido. Estas moléculas derivatizadas incluyen, por ejemplo, aquellas moléculas en las cuales los grupos amino libres han sido derivatizados para formar clorhidratos de amina, grupos p-toluen-sulfonilo, grupos carbobenzoxi, grupos t-butiloxicarbonilo, grupos

cloroacetilo o grupos formales. Los grupos carboxilo libres se pueden derivatizar para formar sales, ésteres, amidas o hidrazidas. Los grupos hidroxilo libres se pueden derivatizar para formar derivados de O-acilo u O-alquilo. El imidazol-nitrógeno de histidina se puede derivatizar para formar N-im-bencilhistidina. También se están incluidos como derivados o análogos aquellos péptidos que contienen uno o más derivados de aminoácidos de origen natural de los veinte aminoácidos estándar, por ejemplo, 4-hidroxiprolina, 5-hidroxilisina, 3-metilhistidina, homoserina, ornitina o carboxiglutamiato, y pueden incluir aminoácidos que no están vinculados por enlaces peptídicos. Estos derivados peptídicos se pueden incorporar durante la síntesis de un péptido o un péptido se puede modificar por medio de métodos de modificación química bien conocidos (véase, por ejemplo, Glazer y colaboradores, Chemical Modification of Proteins, Selected Methods and Analytical Procedures, Elsevier Biomedical Press, Nueva York (1975)).

El término “marcador detectable” comprende tanto marcadores seleccionables como marcadores de ensayo. El término “marcadores seleccionables” se refiere a una variedad de productos génicos para los cuales las células transformadas con una construcción de expresión se pueden seleccionar o identificar, incluyendo marcadores de resistencia a fármacos, marcadores antigénicos útiles en la

clasificación de células activadas con fluorescencia, marcadores de adherencia tales como receptores para ligandos de adherencia que permiten la adherencia selectiva y similares.

El término "respuesta detectable" se refiere a cualquier señal o respuesta que pueda ser detectada en un ensayo, el cual se puede realizar con o sin un reactivo de detección. Las respuestas detectables incluyen, pero no están limitadas a, desintegración radioactiva y emisión de energía (por ejemplo, fluorescente, ultravioleta, infrarroja, visible), absorción, polarización, fluorescencia, fosforescencia, transmisión, reflexión o transferencia de resonancia. Las respuestas detectables también incluyen movilidad cromatográfica, turbidez, movilidad electroforética, espectro de masas, espectro ultravioleta, espectro infrarrojo, espectro de resonancia magnética nuclear y difracción de rayos x. Alternativamente, una respuesta detectable puede ser el resultado de un ensayo para medir una o más propiedades de un material biológico, tal como el punto de fusión, densidad, conductividad, ondas acústicas superficiales, actividad catalítica o composición elemental. Un "reactivo de detección" es cualquier molécula que genere una respuesta detectable que es indicativa de la presencia o ausencia de una sustancia de interés. Los reactivos de

detección incluyen cualquiera de una variedad de moléculas, tales como anticuerpos, secuencias de ácidos nucleicos y enzimas. Para facilitar la detección, un reactivo de detección puede comprender un marcador.

El término "desvitalización", como se utiliza en este documento en todas sus formas gramaticales, es cualquier proceso el cual vuelve un tejido sustancial o esencialmente libre de células reproductiva o metabólicamente viables, sin dejar necesariamente el tejido esencialmente libre de estas células y componentes celulares.

El término "etiqueta diferencial" como se utiliza en este documento se refiere en general a un colorante, tinte, marcador o anticuerpo utilizado para caracterizar o contrastar estructuras, componentes o proteínas de una célula u organismo individual.

El término "diferenciación" como se utiliza en este documento se refiere al proceso de desarrollo con un incremento en el nivel de organización o complejidad de una célula o tejido, acompañado por una función más especializada.

Los términos "enfermedad" o "trastorno" como se utilizan en este documento se refieren a un deterioro de la salud o una condición de funcionamiento anormal.

El término "desinfección", como se utiliza en

este documento en todas sus formas gramaticales, es cualquier proceso el cual vuelve un tejido esencialmente libre de organismos patógenos viables y virus al destruirlos o inhibir de otra manera su crecimiento o actividad vital.

El término "tinte" (también referido como "fluorocromo" o "fluoróforo") como se utiliza en este documento, se refiere a un componente de una molécula que causa que la molécula sea fluorescente. El componente es un grupo funcional en la molécula que absorbe energía de una longitud de onda específica y emite de nuevo energía en una longitud de onda diferente (pero igualmente específica). La cantidad y la longitud de onda de la energía emitida dependen tanto del tinte como del ambiente químico del tinte. Se conocen muchos tintes que incluyen, pero no están limitados a, FITC, R-ficoeritrina (PE), Tándem de PE-Rojo Texas, Tándem de PE-Cy5, propidio yodem, EGFP, EYGP, ECF, DsRed, aloficocianina (APC), PerCp, Verde SYTOX, cumarina, Fluors Alexa (350, 430, 488, 532, 546, 555, 568, 594, 633, 647, 660, 680, 700, 750), Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, Hoechst 33342, DAPI, Hoechst 33258, Azul SYTOX, cromomicina A3, mitramicina, YOYO-1, Anaranjado SYTOX, bromuro de etidio, 7-AAD, anaranjado de acridina, TOTO-1, TO-PRO-1, anaranjado de tiazol, TOTO-3, TO-PRO-3, anaranjado de tiazol, yoduro de propidio (PI), LDS 751, Indo-1, Fluo-3,

DCFH, DHR, SNARF, Y66F, Y66H, EBFP, GFPuv, ECFP, GFP, AmCyanl, Y77W, S65A, S65C, S65L, S65T, ZsGreenl, ZsYellowl, DsRed2, monómero de DsRed, AsRed2, mRFP1, HcRedl, monoclorobimano, calceína, las Fluors DyLight, cianina, hidroxicumarina, aminocumarina, metoxicumarina, Azul Cascada, Amarillo Lucifer, NBD, conjugados de PE-Cy5, conjugados de PE-Cy7, conjugados de APC-Cy7, Rojo 613, fluoresceína, FluorX, BODIDY-FL, TRITC, X-rodamina, Lisamina Rodamina B, Roja Texas, TruRed y derivados de los mismos.

El término "no expandido" como se utiliza en este documento se refiere a una población de células que no ha sido desarrollada en cultivo (in vitro) para incrementar el número de células en la población de células.

El término "endógeno" como se utiliza en este documento, se refiere a aquel el cual es de origen natural, está incorporado dentro, alojado dentro, adherido a, unido a o residente en.

El término "matriz extracelular" como se utiliza en este documento se refiere a un andamio en un ambiente externo de la célula con el cual la célula interactúa a través de receptores de la superficie celular específicos. La matriz extracelular sirve para muchas funciones, que incluyen, pero no están limitadas a, proporcionar soporte y anclaje para células, segregar un tejido de otro tejido y

regular la comunicación intracelular. La matriz extracelular está compuesta de una malla entrelazada de proteínas fibrosas y glicosaminoglicanos (GAGs). Los ejemplos de proteínas fibrosas encontradas en la matriz extracelular incluyen colágeno, elastina, fibronectina, y laminina. Los ejemplos de GAGs encontrados en la matriz extracelular incluyen proteoglicanos (por ejemplo, sulfato de heparina), sulfato de condroitina, sulfato de queratina y polisacárido diferente de proteoglicano (por ejemplo, ácido hialurónico). El término "proteoglicano" se refiere a un grupo de glicoproteínas que contienen una proteína de núcleo a la cual se unen uno o más glicosaminoglicanos.

El término "factores" como se utiliza en este documento se refiere a componentes no vivos que tienen un efecto químico o físico. Por ejemplo, un "factor paracrino" es una molécula de señalización difundible que es secretada de un tipo de célula que actúa sobre otro tipo de células en un tejido. Un "factor de transcripción" es una proteína que se une a secuencias de ADN específicas y de ese modo controla la transferencia de la información genética de ADN a ARNm.

El término "fluorescencia" como se utiliza en este documento se refiere al resultado de un proceso de tres estados que ocurre en ciertas moléculas, referido generalmente como "fluoróforos" o "tintes fluorescentes",

cuando una molécula o nanoestructura se relaja a su estado fundamental después de ser excitada eléctricamente. La Etapa 1 implica la excitación de un fluoróforo a través de la absorción de energía luminosa; La Etapa 2 implica una vida excitada transitoria con alguna pérdida de energía; y la Etapa 3 implica el regreso del fluoróforo a su estado fundamental acompañado por la emisión de luz.

El término "clasificación de células activadas por fluorescencia" (también referido como "FACS") como se utiliza en este documento se refiere a un método para clasificar una mezcla heterogénea de células biológicas en uno o más recipientes, una célula a la vez, con base en la dispersión de luz específica y las características de fluorescencia de cada célula.

El término "fosa" como se utiliza en este documento significa una pequeña cavidad o depresión, como en un hueso.

El término "fragmento" como se utiliza en este documento se refiere a una pequeña parte, la cual puede ser, sin exclusión, una partícula, trocito o fibra, derivado, cortado o roto de una unidad más grande la cual retiene la actividad biológica deseada de la unidad más grande.

Los términos "equivalente funcional" o "funcionalmente equivalente" se utilizan de manera

intercambiable en este documento para referirse a sustancias, moléculas, polinucleótidos, proteínas, péptidos o polipéptidos que tienen efectos o uso similares o idénticos.

El término "injerto" como se utiliza en este documento se refiere a un tejido u órgano trasplantado de un donador a un receptor. Éste incluye, pero no está limitado a, un auto-tejido transferido de un sitio del cuerpo a otro en el mismo individuo ("injerto autólogo"), un tejido transferido entre individuos genéticamente idénticos o inmunológicamente compatibles de manera suficiente para permitir el trasplante de tejido ("injerto singénico"), un tejido transferido entre miembros genéticamente diferentes de la misma especie ("injerto alogénico" o "aloinjerto") y un tejido transferido entre diferentes especies ("xenoinjerto").

El término "crecimiento" como se utiliza en este documento se refiere a un proceso para volverse más grande, más largo o más numeroso, o un incremento en tamaño, número o volumen.

El término "conducción de crecimiento" como se utiliza en este documento se refiere a un proceso por medio del cual un tejido se dirige a regenerarse o crecer con el fin de adaptarse a la superficie de un material. Una superficie conductiva de crecimiento es una que permite el

crecimiento de tejido sobre su superficie o hacia abajo dentro de poros, canales o tubos. El material conductivo de crecimiento facilita la formación espontánea de un tejido al proporcionar un microambiente que soporta la deposición o adhesión de células tejidogénicas y opcionalmente, la vascularización. Los ejemplos de materiales conductivos de crecimiento incluyen, pero no están limitados a, hueso humano procesado (por ejemplo, hueso de aloinjerto, el cual puede ser un material osteoconductivo), colágeno purificado, cerámica de fosfato de calcio, polímeros sintéticos, matrices derivadas de tejido, BMP-2 y 4, VEGF, bFGF, TGF-β y PDGF.

El término "matriz conductiva de crecimiento" como se utiliza en este documento se refiere a una matriz que puede ser inerte en o por sí misma pero la cual sostiene la formación de tejido tridimensional. Por ejemplo, el tejido óseo de aloinjerto puede ser una matriz osteoconductiva.

El término "factor de crecimiento" como se utiliza en este documento se refiere a moléculas de polipéptidos extracelulares que se unen a un receptor de la superficie celular que activa una vía de señalización intracelular, que conduce a la proliferación, diferenciación u otra respuesta celular. Los factores de crecimiento incluyen, pero no están limitados a, citocinas

y hormonas.

El término "inducción del crecimiento" como se utiliza en este documento se refiere a un proceso por medio del cual células primitivas, no indiferenciadas y tejidogénicas son estimuladas para desarrollarse en un conjunto de células, no necesariamente idénticas, que llevan a cabo juntas una función específica. Este conjunto de células se denomina un tejido.

El término "matriz inductiva del crecimiento" como se utiliza en este documento se refiere a una matriz que contiene una sustancia o sustancias capaces de reclutar o estimular células tejidogénicas locales de modo que las células sean inducidas (lo que significa causar, provocar o activar) para diferenciarse y/o producir un tejido.

Los términos "componentes inductivos del crecimiento" o "factores inductivos del crecimiento" o "factores tejidogénicos" se utilizan de manera intercambiable para referirse a la abundancia de mediadores asociados con el desarrollo y reparación de tejidos.

Por ejemplo, la Tabla 11 lista factores inductivos del crecimiento ejemplares que son secretados por tejido adiposo clasificados de acuerdo con la función metabólica, inmunológica u otra función. (Halberg ***y colaboradores***, 2008, Endocrinol. Metab. Clin. North Am., 37(3): 753-767). El secretoma adiposo subcutáneo incluye

adiponectina, leptina, IL-6, IL-7, IL-8, MCP-1, GRO, angiogenina, HGF, VEGF, TIMP-1, TIMP-2, etcétera (Klimkakova *y colaboradores*, 2007, Biochem Biophys. Res. Commun., 358: 897-902).

Tabla 11. Factores Diferentes de ECM Solubles Secretados de Secretoma Adiposo

Factores Metabólicos	Factores Inmunológicos	Otros Factores
Adipsina	Glicoproteína ácida alfa 1	Angiogenina
Adiponectina	Factor estimulador de colonias-1	Angiopoyetina 1
Apelina	Inhibidor de componentes del complemento C1	Angiopoyetina 2
ApoE	Complemento C1	Angiotensinógeno
Cortisol	Complemento C2	Calcitonina
Factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1)	Complemento C3	Quemerina
Factor de crecimiento similar a la insulina (IGF)	Complemento C4	Ciclofilina A
Proteína de unión 7 (Bp 7)	Complemento C 7	SOD extracelular
Lipoproteína lipasa	Factor de complemento B	Galectina 1
Leptina	Factor de complemento C	Oncogen relacionado con el crecimiento (GRO)
Factor adiposo inducido por ayuno	Factor de complemento D	Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)

Inhibidor activado por plasminógeno-1	Proteína reactiva C	Factor de crecimiento hepático (GF)
Resistina	Haptoglobina	Factor de liberación de mineralocorticoide (MRF)
Proteína de unión de retinol 4	Interleucina 1 beta (IL-1β)	Proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1)
Vaspina	Interleucina 4 (IL-4)	Factor de crecimiento nervioso (NGF)
Vistafina	Interleucina 6 (IL-6)	Factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF)
	Interleucina 7 (IL-7)	Prostaglandina E2
	Interleucina 8 (IL-8)	Prostaglandina I2
	Interleucina 10 (IL-10)	Prostaglandina 2alfa
	Interleucina 12 (IL-12)	Transferencia de suero
	Interleucina 18 (IL-18)	Factor derivado estromal 1
	Lipocalina 24p3	TGF beta
	Factor inhibitorio de la migración de macrófagos 1	TIMP-1
	Amiloide sérico A3 (SAA3)	TIMP-2
	Factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α)	Factor tisular
		Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)

El término "células madre hematopoyéticas" se

refiere a una célula aislada de la sangre o de la médula ósea que se puede renovar por sí misma, se puede diferenciar a una variedad de células especializadas, se puede movilizar fuera de la médula ósea dentro de la sangre circulante y experimenta la muerte celular programada (apoptosis). De acuerdo con algunas modalidades de la invención descrita, las células madre hematopoyéticas derivadas de sujetos humanos expresan por lo menos un tipo de marcador de la superficie celular que incluye, pero no está limitado a, CD34, CD38, HLA-DR, c-kit, CD59, Sca-1, Thy-1 y/o CXCR-4, o una combinación de los mismos.

"HLA-DR" se refiere a un antígeno de histocompatibilidad clase II de humano que está presente en varios tipos de células, que incluyen células que presentan antígenos, células B, monocitos, macrófagos y células T activadas.

El término "interleucina" como se utiliza en este documento se refiere a una citocina secretada por glóbulos blancos como un medio de comunicación con otros glóbulos blancos.

El término "implante" se refiere a cualquier dispositivo o material insertado o colocado, de manera permanente o temporal, dentro o sobre un sujeto, así como también aquellos utilizados para la administración o suministro de un(unos) agente(s) terapéutico(s) o

sustancia.

El término "mejorar" (o mejoramiento) como se utiliza en este documento se refiere a llevar a una condición más deseable o excelente.

Los términos "en el cuerpo", "volumen hueco", "receptáculo de resección", "excavación", "sitio de inyección", "sitio de deposición" o "sitio de implante" como se utilizan en este documento tienen la intención de incluir todos los tejidos del cuerpo sin límite y pueden referirse a espacios formados en el mismo a partir de inyecciones, incisiones quirúrgicas, remociones de tumores o tejidos, lesiones de tejidos, formación de abscesos o cualquier otra cavidad, espacio o receptáculo similar formado de esta manera por la acción de la valoración clínica, tratamiento o respuesta fisiológica a una enfermedad o patología como ejemplos no limitantes de los mismos.

El término "indicador" como se utiliza en este documento se refiere a cualquier sustancia, número o relación derivado de una serie de hechos observados que pueden revelar cambios relativos como una función de tiempo; o una señal, signo, marca, nota o síntoma que es visible o es evidencia de la existencia o presencia del mismo.

El término "inflamación", como se utiliza en este

documento se refiere al proceso fisiológico por medio del cual tejidos vascularizados responden a una lesión. Véase, por ejemplo, FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY, 4ª Edición, William E. Paul, ed. Lippincott-Raven Publishers, Filadelfia (1999) en 1051-1053, incorporado en este documento a manera de referencia. Durante el proceso inflamatorio, las células involucradas en la desintoxicación y reparación son movilizadas al sitio comprometido por mediadores inflamatorios. La inflamación se caracteriza frecuentemente por una fuerte infiltración de leucocitos en el sitio de la inflamación, particularmente neutrófilos (células polimorfonucleares). Estas células promueven el daño de tejido al liberar sustancias tóxicas en la pared vascular o en un tejido no lesionado. Tradicionalmente, la inflamación ha sido dividida en respuestas agudas y crónicas.

El término "inflamación aguda" como se utiliza en este documento se refiere a una respuesta rápida, de corta duración (de minutos a días), relativamente uniforme a una lesión aguda caracterizada por acumulaciones de fluido, proteínas plasmáticas y leucocitos neutrófilos. Los ejemplos de agentes perjudiciales que causan la inflamación aguda incluyen, pero no están limitados a, agentes patógenos (por ejemplo, bacterias, virus, parásitos), cuerpos extraños de fuentes exógenas (por ejemplo asbestos) o endógenas (por ejemplo, cristales de urato, complejos

inmunes) y agentes físicos (por ejemplo, quemaduras) o químicos (por ejemplo, sustancias cáusticas).

El término "inflamación crónica" como se utiliza en este documento se refiere a la inflamación que es de duración más prolongada y la cual tiene una terminación incierta e indefinida. La inflamación crónica tiene lugar cuando la inflamación aguda persiste, ya sea a través del aclaramiento incompleto del agente inflamatorio inicial o como resultado de múltiples eventos agudos que ocurren en la misma ubicación. La inflamación crónica, la cual incluye el influjo de linfocitos y macrófagos y el crecimiento de fibroblastos, puede dar por resultado la cicatrización del tejido en sitios de actividad inflamatoria prolongada o repetida.

El término "lesión", como se utiliza en este documento, se refiere al daño o perjuicio a una estructura o función del cuerpo causado por un agente o fuerza externo, el cual puede ser físico o químico.

El término "aislar" y sus diversas formas gramaticales como se utilizan en este documento se refiere a la colocación, separación u obtención de una proteína, molécula, sustancia, ácido nucleico, péptido, célula o partícula, en una forma esencialmente libre de contaminantes u otros materiales con los cuales está asociado comúnmente, separado de su ambiente natural.

El término "etiquetado" como se utiliza en este documento se refiere a un proceso para distinguir un compuesto, estructura, proteína, péptido, anticuerpo, célula o componente celular por la introducción de un constituyente rastreable. Los constituyentes rastreables comunes incluyen, pero no están limitados a, un anticuerpo fluorescente, fluoróforo, tinte o tinte fluorescente, colorante o colorante fluorescente, marcador, marcador fluorescente, colorante químico, colorante diferencial, etiqueta diferencial y radioisótopo.

El término "lábil", como se utiliza en este documento se refiere a aquello sujeto a la degradación incrementada.

Los términos "marcador" o "marcador de la superficie celular" se utilizan de manera intercambiable en este documento para referirse a un determinante antigénico o epítopo encontrado sobre la superficie de un tipo específico de célula. Los marcadores de la superficie celular pueden facilitar la caracterización de un tipo de célula, su identificación y eventualmente su aislamiento. Las técnicas de clasificación de células se basan en biomarcadores celulares donde un(unos) marcador(es) de la superficie celular se puede(n) utilizar para ya sea la selección positiva o la selección negativa, es decir, para la inclusión o exclusión, de una población de células.

El término "matriz" se refiere a una sustancia circundante dentro de la cual está contenido o incorporado algo.

El término "agitación mecánica" como se utiliza en este documento se refiere a un proceso por medio del cual el tejido se agita o bate físicamente a través de medios mecánicos. Estos medios mecánicos incluyen, pero no están limitados a, una mezcladora u otro dispositivo mecánico.

El término "células madre mesenquimales (MSCs)" como se utiliza en este documento se refiere a células madre adultas que no son de sangre encontradas en una variedad de tejidos. Éstas se caracterizan morfológicamente por su forma de husillo; por la expresión de marcadores específicos en su superficie celular; y por su capacidad bajo condiciones apropiadas, para diferenciarse a lo largo de un mínimo de tres linajes (osteogénicos, condrogénicos y adipogénicos). Cuando se hace referencia al hueso o cartílago, las MSCs son conocidas comúnmente como osteocondrogénicas, osteogénicas o condrogénica, puesto que una MSC individual ha mostrado la capacidad de diferenciarse en condrocitos u osteoblastos, dependiendo del medio.

Las MSCs secretan muchas moléculas biológicamente importantes, que incluyen interleucinas 6, 7, 8, 11, 12, 14

y 15, M-CSF, ligando de Flt-3, SCF, LIF, bFGF, VEGF, PIGF y MCP1 (Majumdar y colaboradores, J. Cell Physiol. 176: 57-66 (1998), Kinnaird y colaboradores, Circulation 109: 1543-49 (2004)). En 2004, se reportó que todavía no se había identifico un marcador individual que identifique definitivamente las MSCs in vivo, debido a la falta de consenso de diversas documentaciones del fenotipo de MSC. Baksh y colaboradores, J. Cell. Mol. Med. 8(3): 301-16, 305 (2004). Existe un acuerdo general respecto a que las MSCs carecen de antígenos hematopoyéticos típicos, específicamente, CD14, CD34 y CD45. (Id.; citando Pittenger, M.F. y colaboradores, Science 284: 143-47 (1999)).

El término "moler" y sus diversas formas gramaticales, como se utiliza en este documento se refiere a operaciones realizadas para triturar, cortar, desmenuzar, picar o pulverizar una sustancia, o el equipo para realizar estas operaciones sobre una sustancia. El término "moler en estado congelado" y sus diversas formas gramaticales, como se utiliza en este documento se refiere a moler una sustancia en un estado congelado o el equipo para realizar estas operaciones.

El término "espesor de la sección montada" como se utiliza en este documento se refiere al espesor de secciones de tejido después del procesamiento histológico.

El término "multipotente" como se utiliza en este documento se refiere a una célula capaz de dar origen a un número limitado de tipos de células de una línea de células particular.

El término "miogénico" se refiere a un potencial de células precursoras no diferenciadas para diferenciarse en células formadoras de músculo o miocompetentes.

El término "Disector Óptico" se refiere a una sonda estereológica para contar o seleccionar objetos en una sección de tejido. Esta es una extensión para el método de Disector básico, el cual se aplica a una sección gruesa utilizando una serie, o una pila, de Disectores. Preferiblemente que el uso de pares de secciones físicas (el método de Disector básico), el seccionamiento óptico se utiliza al crear planos focales con una profundidad de campo delgada a través de la sección. El Disector Óptico comienza con una sección de búsqueda en la parte superior del Disector Óptico y termina con una sección de referencia en el fondo del disector óptico. El plano focal es la sección de referencia actual. La sección de búsqueda está inmediatamente arriba del plano focal. Una partícula en el foco en la parte superior del disector óptico se observa por lo tanto en la sección de búsqueda y no se cuenta. Una partícula en el foco en el fondo del disector óptico está en la sección de referencia y por lo tanto no está en la

sección de búsqueda, se cuenta. Las reglas del marco de conteo se aplican cuando la partícula se enfoca primero.

El término "osteoblastos" como se utiliza en este documento se refiere a células que surgen cuando células osteoprogenitoras o células mesenquimales, las cuales están localizadas cerca de todas las superficies óseas y dentro de la médula ósea, se diferencian bajo la influencia de factores de crecimiento. Los osteoblastos, los cuales son responsables de la síntesis de la matriz ósea, secretan una sustancia molida rica en colágeno que es esencial para la mineralización posterior de hidroxiapatita y otros cristales. El colágeno se trenza para formar osteoides (fibras espirales de la matriz ósea). Los osteoblastos causan que las sales de calcio y fósforo se precipiten de la sangre, las cuales se unen con el osteoide recientemente formado para mineralizar el tejido óseo. Una vez que los osteoblastos son atrapados en la matriz que secretan, éstos se vuelven osteocitos. Desde el menos diferenciado hasta el diferenciado terminalmente, el linaje de osteocitos es (i) una unidad formadora de colonias-fibroblasto (CFU-F); (ii) una célula madre mesenquimal/célula estromal medular (MSC); (iii) un osteoblasto; y (iv) un osteocito.

El término "osteocalcina" como se utiliza en este documento se refiere a un constituyente proteínico del hueso; los niveles en circulación se utilizan como un

marcador de la renovación ósea incrementada.

El término "osteoclasto" como se utiliza en este documento se refiere a células multinucleadas grandes que están asociadas con áreas de resorción ósea (descomposición).

El término "osteoconducción" como se utiliza en este documento se refiere a un proceso por medio del cual el hueso es dirigido con el fin de adaptarse a la superficie de un material. Una superficie osteoconductiva es una que permite el crecimiento del hueso sobre su superficie o hacia abajo dentro de poros, canales o tubos. El material osteoconductivo facilita la formación espontánea de hueso al proporciona un microambiente que sostiene el crecimiento hacia adentro de vasos sanguíneos, tejido perivascular y células osteoprogenitoras dentro del sitio donde se deposita. Los ejemplos de materiales osteoconductivos incluyen, pero no están limitados a, hueso humano procesado (por ejemplo, hueso de aloinjerto), colágeno purificado, cerámica de fosfato de calcio, polímeros sintéticos, BMP-2 y 4, VEGF, bFGF, TGF-β y PDGF.

El término "matriz osteoconductiva" como se utiliza en este documento se refiere a una matriz que es inerte en y por sí misma pero sobre la cual las células pueden escalar y desarrollar hueso.

El término "osteogénico" se refiere a un

potencial de células precursoras no diferenciadas para diferenciarse en células formadoras de hueso u osteocompetentes.

El término "osteogénesis" como se utiliza en este documento se refiere al desarrollo o formación de nuevo hueso por células formadoras de hueso u osteocompetentes.

El término "osteoinducción" como se utiliza en este documento se refiere a un proceso por medio del cual células primitivas, no diferenciadas y pluripotentes se estimulan para desarrollarse en un linaje de células formadoras de hueso induciendo de ese modo la osteogénesis. Por ejemplo, la mayoría de la curación de huesos en una fractura es dependiente de la osteoinducción. Los materiales osteoinductivos se pueden generar al combinar un andamio poroso con células osteogénicas y/o componentes osteoinductivos que incluyen, pero no están limitados a, factores de crecimiento tales como BMP-2 y 4, VEGF, bFGF, TGF-β y PDGF.

El término "matriz osteoinductiva" como se utiliza en este documento se refiere a una matriz que contiene una sustancia o sustancias que reclutan células locales para inducir (lo que significa causar, provocar o activar) células locales para producir hueso.

Los términos "componentes osteoinductivos" o "factores osteogénicos" se utilizan de manera

intercambiable para referirse a la abundancia de mediadores asociados con el desarrollo y reparación de huesos que incluyen, pero no están limitados a, proteínas morfogénicas óseas (BMPs), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento transformante beta (TGFβ) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).

El término "osteointegración" se refiere a un mecanismo de anclaje por medio del cual los componentes no vitales se pueden incorporar de manera confiable en un hueso vivo y que persisten bajo todas las condiciones normales de carga.

El término "partícula" como se utiliza en este documento se refiere a un trocito, fragmento, recorte, fibra u otro constituyente pequeño de un cuerpo más grande (por ejemplo, picopartículas, nanopartículas, micropartículas, milipartícula, centipartícula, decipartícula; fracciones de las mismas o, en algunos casos, un segmento o pieza más grande).

El término "pieza" como se utiliza en este documento se refiere a una partícula, sección, tira, trocito, fragmento, recorte, fibra u otra parte, derivada, cortada o rota de una unidad más grande.

El término "péptido" se utiliza en este documento para referirse a dos o más aminoácidos unidos por un enlace

peptídico.

El término "periostio" como se utiliza en este documento se refiere a la inversión normal de hueso, que constituye una capa exterior fibrosa, densa, a la cual se unen los músculos, y una capa interior, más delicada capaz de formar hueso.

El término "Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas" (PDGF) como se utiliza en este documento se refiere a un mitógeno mayor para células de tejido conectivo y otros ciertos tipos de células. Éste es una molécula dimérica que consiste de cadenas de polipéptidos A y B similares estructuralmente, unidas a disulfuro, las cuales se combinan para homo- y hetero-dímeros. Las isoformas de PDGF ejercen sus efectos celulares al unirse a y activar dos receptores de proteína tirosina cinasa relacionados estructuralmente, el α-receptor y el β-receptor. La activación de receptores de PDGF conduce a la estimulación del crecimiento de células, pero también a cambios en la forma y motilidad de las células; el PDGF induce la reorganización del sistema de filamentos de actina y estimula la quimiotaxis, es decir, un movimiento de células dirigido hacia un gradiente de PDGF. In vivo, el PDGF desempeña un papel en el desarrollo embriónico y durante la curación de heridas.

El término "pluripotente" como se utiliza en este

documento se refiere a la capacidad para desarrollarse en múltiples tipos de células, que incluyen los tres linajes embriónicos, que forman los órganos del cuerpo, sistema nervioso, piel, músculo y esqueleto.

El término "célula progenitora" como se utiliza en este documento se refiere a un descendiente temprano de una célula madre que solo se puede diferenciar, pero que ya no se puede renovar por sí mismo. Las células progenitoras maduran en células precursoras que maduran en fenotipos maduros. Las células progenitoras hematopoyéticas son referidas como unidades formadoras de colonias (CFU) o células formadoras de colonias (CFC). El linaje específico de una célula progenitora es indicado por un sufijo, tal como, pero no limitado a, CFU-E (eritrocítico), CFU-F (fibroblástico), CFU-GM (granulocítico/macrófago) y CFU-GEMM (progenitor hematopoyético pluripotente). Los osteoclastos surgen de células hematopoyéticas del linaje de monocitos/neutrófilos (CFU-GM). Las células osteoprogenitoras surgen de células madre mesenquimales y son comprometidas a un linaje de osteocitos.

El término "propagar" como se utiliza en este documento se refiere a reproducir, multiplicar o a incrementar en número, cantidad o grado por medio de cualquier proceso.

El término "purificación" como se utiliza en este

documento se refiere al proceso de aislamiento o liberación de elementos foráneos, extraños u objetables.

El término “aleatorio” como se utiliza en este documento se refiere a no predecible. Existen algunos elementos de probabilidad. Esto es lo opuesto de determinista, en el cual se puede conocer el siguiente número o evento.

El término “reducido” o “reducir”, como se utiliza en este documento en todas sus formas gramaticales, se refiere a una disminución, una aminoración, una atenuación o rebaja del grado, intensidad, magnitud, tamaño, cantidad, densidad o número de.

El término “regeneración” o “regenerar” como se utiliza en este documento se refiere a un proceso de recreación, reconstitución, renovación, reavivamiento, restauración, diferenciación y crecimiento para formar un tejido con características que se adaptan a una contraparte natural del tejido.

El término “relativo” como se utiliza en este documento se refiere a algo que tiene, o que permanece en, alguna asociación significativa con algo más. El término “frecuencia relativa” como se utiliza en este documento se refiere a la velocidad de ocurrencia de algo que tiene o que permanece en alguna asociación significativa con la velocidad de ocurrencia de algo más. Por ejemplo, dos tipos

de células, células X y células Y ocupan una ubicación determinada. Hay 5 células X y 5 células Y en esa ubicación. La frecuencia relativa del tipo X de células es 5/10; la frecuencia relativa del tipo Y de células es 5/10 en esa ubicación. Después del procesamiento, hay 5 células X, pero solo 1 célula Y en esa ubicación. La frecuencia relativa del tipo X de células después del procesamiento es 5/6 y la frecuencia relativa del tipo Y de células después del procesamiento es 1/6 en esa ubicación.

El término "reparación" como se utiliza en este documento como un sustantivo se refiere a cualquier corrección, refuerzo, reacondicionamiento, remedio, constitución, emisión de sonido, renovación, arreglo, parche o similares que restaura una función. Cuando se utiliza como verbo, significa corregir, reforzar, reacondicionar, remediar, constituir, emitir un sonido, renovar, arreglar, parchar o restaurar de otra manera una función. De acuerdo con algunas modalidades "reparar" incluye reparar completamente o reparar parcialmente.

El término "residente" y sus diversas formas gramaticales, como se utiliza en este documento se refiere a estar presente habitualmente, existir en o intrínseco para o incorporado en el mismo.

El término "enjuagar" y sus diversas formas gramaticales, como se utiliza en este documento se refiere

a lavar, remojar con un líquido o líquidos o hacer fluir un líquido o líquidos sobre el material que es enjuagado.

El término "andamio" como se utiliza en este documento se refiere a una estructura capaz de soportar una formación de tejido tridimensional. Se cree que un andamio tridimensional es crucial para replicar el medio ambiente in vivo y para permitir que las células influyan en su propio microambiente. Los andamios pueden servir para promover la unión y migración de células, para suministrar y retener células y factores bioquímicos, para hacer posible la difusión de nutrientes celulares vitales y productos expresados, y para ejercer ciertas influencias mecánicas y biológicas para modificar el comportamiento de la fase celular. Un andamio utilizado para la reconstrucción de tejido tiene varios requisitos. Este andamio debe tener una porosidad alta y un tamaño de poro adecuado para facilitar la siembra de células y la difusión de tanto células como nutrientes por toda la estructura completa. La biodegradabilidad del andamio también es un requisito esencial. El andamio debe ser absorbido por los tejidos circundantes sin la necesidad de una remoción quirúrgica, de tal manera que la velocidad a la cual ocurra la degradación coincida tan estrechamente como sea posible con la velocidad de formación de tejido. Conforme las células están fabricando su propia estructura de matriz

natural alrededor de las mismas, el andamio proporciona integridad estructural dentro del cuerpo y se degrada eventualmente dejando el neotejido (tejido formado recientemente) para asumir la carga mecánica.

El término "sección" cuando se utiliza en el contexto de la estereología se refiere a un corte a través de un material que tiene un espesor efectivamente cero en comparación con el tamaño de las partículas que son estudiadas. Los biólogos se refieren a secciones como cortes gruesos a través de tejido. El espesor real de las secciones puede conducir al efecto de Holmes.

El término "efecto colateral" como se utiliza en este documento se refiere a un resultado de una terapia además de, o en extensión de, el efecto terapéutico deseado.

El término "similar" se utiliza de manera intercambiable con los términos análogo, comparable o semejante, lo que significa que tiene rasgos o características en común.

El término "reducción de tamaño", como se utiliza en este documento en todas sus formas gramaticales, se refiere a un proceso por medio del cual un objeto, tal como un tejido, se divide o se reduce respecto a su tamaño. Estos procesos incluyen, sin limitación, corte, tajadura, picado, trituración, molienda, molienda en estado

congelado, combinación, homogenización, desgarramiento, desfibración, fracturación, rompimiento, machacado y subdivisión.

Una "solución" se considera generalmente como una mezcla homogénea de dos o más sustancias. Ésta es con frecuencia, aunque no necesariamente, un líquido. Además, las moléculas del soluto (o sustancia disuelta) se distribuyen uniformemente entre aquellas del solvente. El término "solvente" como se utiliza en este documento se refiere a una sustancia capaz de disolver otra sustancia (denominada un "soluto") para formar una mezcla dispersada uniformemente (solución).

El término "colorante" como se utiliza en este documento se refiere a una composición de un(unos) tinte(s) o pigmento(s) utilizado(s) para hacer una estructura, material, célula, componente celular, membrana, gránulo, núcleo, receptor de la superficie celular, péptido, microorganismo, ácido nucleico, proteína o tejido diferenciable.

El término "Sca-1" o "antígeno de célula madre-1" se refiere a un componente proteínico de la superficie en una ruta de señalización que afecta la capacidad de auto-renovación de células madre mesenquimales.

El término "células madre" se refiere a células no diferenciadas que tienen un alto potencial proliferativo

con la capacidad de auto-renovarse (hacer más células madre por medio de la división celular) que pueden generar células hijas que se pueden someter a la diferenciación terminal en más de un fenotipo distinto de células.

El término "estereología" como se utiliza en este documento se refiere a un método para cuantificar estructuras 2D y 3D utilizando métodos de estimación.

El término "esterilización", como se utiliza en este documento en todas sus formas gramaticales, es cualquier proceso que hace que un objeto (por ejemplo, un tejido, un recipiente para tejido o un implemento para procesar tejido) esté sustancialmente libre de organismos patógenos y/o virus al destruirlos o inhibir de otra manera su crecimiento o actividad vital. Estos procesos pueden incluir la exposición del objeto a uno o más, sin limitación, de la radiación gamma, radiación de haces electrónicos, agentes químicos (por ejemplo, alcohol, fenol, óxido de etileno gaseoso, ácidos, bases o peróxidos), calor o radiación ultravioleta por una duración y dosificaciones suficientes. Cuando la esterilización se realiza en un producto de tejido terminado en su empaque final, el proceso puede ser referido como "esterilización terminal".

El término "estimular", como se utiliza en este documento en todas sus formas gramaticales, como se utiliza

en este documento se refiere a activar, provocar o incitar. El término "agente estimulador" como se utiliza en este documento se refiere a una sustancia que ejerce alguna fuerza o efecto.

El término "subcutáneo", como se utiliza en este documento con referencia a tejidos, se refiere a tejidos que están debajo de la dermis y no son parte de la dermis (es decir, la hipodermis), y se puede utilizar de manera intercambiable con el término "subdérmico".

La frase "sujeto en necesidad del mismo", como se utiliza en este documento se refiere a un paciente que (i) se la administrará por lo menos un aloinjerto, (ii) está recibiendo por lo menos un aloinjerto; o (iii) ha recibido por lo menos un aloinjerto, a menos que el contexto y el uso de la frase indique lo contrario.

El término "sustancialmente similar" como se utiliza en este documento significa que un primer valor, aspecto, rasgo, cualidad, número o cantidad es de por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90% o por lo menos 95% de un segundo valor, aspecto, rasgo, cualidad, número o cantidad.

El término "surfactante", como se utiliza en este documento se refiere a un agente tensoactivo que actúa para reducir la tensión superficial, la cual es la fuerza de tipo elástica que existe en la superficie de un cuerpo, por

ejemplo, un líquido, en una zona interfacial entre dos líquidos, o aquella entre un líquido y un sólido, que tiende a minimizar el área de la superficie, causada por asimetrías en las fuerzas intermoleculares entre las moléculas de la superficie. Los surfactantes son usualmente compuestos orgánicos que contienen tanto grupos hidrófobos como grupos hidrófilos, es decir, son anfifílicos. Los surfactantes pueden ser aniónicos, catiónicos, no iónicos y zwitteriónicos. Los surfactantes ejemplares incluyen, pero no están limitados a, Triton^{MR}, Tween 80^{MR}, lecitina de huevo, succinato de vitamina E-t d-α-tocoferilo polietilenglicol 1000 (TPGS). Los surfactantes ejemplares que son adecuados para el uso en esta invención se describen en, por ejemplo, Becher, Emulsions Theory and Practice; Robert E. Krieger Publishing, Malabar, Fla. (1965), el cual se incorpora en este documento a manera de referencia.

El término “síntoma” como se utiliza en este documento se refiere a un signo o una indicación de trastorno o enfermedad, especialmente cuando es experimentado por un individuo como un cambio de una función, sensación o apariencia normal.

El término “efecto terapéutico” como se utiliza en este documento se refiere a una consecuencia del tratamiento, los resultados del cual se juzga que son

deseables o benéficos. Un efecto terapéutico puede incluir, directa o indirectamente, la detención, reducción o eliminación de una manifestación de una enfermedad. Un efecto terapéutico también puede incluir, directa o indirectamente, la detención, reducción o eliminación del progreso de una manifestación de enfermedad.

El término "tejidogénico" como se utiliza en este documento se refiere a un potencial de una célula precursora no diferenciada para diferenciarse en un tipo de célula madura y para regenerar un tejido. Las células tejidogénicas ejemplares incluyen pero no están limitadas a una célula madre, una célula progenitora o una combinación de las mismas. El término "osteogénico" se refiere más específicamente a la diferenciación de células y la regeneración de tejidos con respecto al hueso.

El término "vía de señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGFβ)" se utiliza en este documento para referirse a la vía de señalización que está involucrada en muchos procesos celulares en tanto el organismo adulto como el embrión en desarrollo que incluyen el crecimiento de células, diferenciación de células, apoptosis, homeostasis celular y otras funciones celulares. Los ligandos de la superfamilia de TGFβ se unen a un receptor tipo II, el cual recluta y fosforila un receptor tipo I. El receptor tipo I entonces fosforila los SMADs

regulados por receptores (R-SMADs) los cuales ahora se pueden unir al coSMAD SMAD4. Los complejos de R-SMAD/coSMAD se acumulan en el núcleo donde actúan como factores de transcripción y participan en la regulación de la expresión de genes objetivo.

El término "tratar" o "tratamiento" incluye anular, inhibir sustancialmente, detener la velocidad de o invertir el progreso de una enfermedad, condición o trastorno, mejorar sustancialmente los síntomas clínicos o estéticos de una condición, prevenir sustancialmente la aparición de síntomas clínicos o estéticos de una enfermedad, condición o trastorno y proteger de síntomas perjudiciales o molestos. El tratamiento se refiere además a la realización de uno o más de los siguientes: (a) reducción de la gravedad del trastorno; (b) limitación del desarrollo de síntomas característicos del(los) trastorno(s) que es(son) tratado(s); (c) la limitación del empeoramiento de síntomas característicos del(los) trastorno(s) que es(son) tratado(s); (d) la limitación de la recurrencia del(los) trastorno(s) en pacientes que han tenido previamente el(los) trastorno(s); y (e) la limitación de la recurrencia de síntomas en pacientes que fueron asintomáticos previamente para el(los) trastorno(s).

El término "vascularización" como se utiliza en este documento se refiere a un proceso de crecimiento hacia

adentro de vasos sanguíneos y tejido perivascular dentro de una matriz conductiva de crecimiento para sostener la deposición y adhesión de células tejidogénicas para efectuar la regeneración de tejido.

Los términos "VEGF", "VEGF-1" o "factor de crecimiento endotelial vascular-1" se utilizan de manera intercambiable en este documento para referirse a una citocina que media numerosas funciones de células endoteliales que incluyen la proliferación, migración, invasión, supervivencia y permeabilidad. El término "VEGF-2" se refiere a un regulador para el crecimiento de células endoteliales vasculares y de músculo liso. El VEGF-2 estimula el crecimiento de células endoteliales vasculares de humano pero inhibe el crecimiento de células de músculo liso aórtico de humano inducidas por el factor de crecimiento derivado de plaquetas.

El término "viable" como se utiliza en este documento se refiere a tener la capacidad de crecer, expandirse o desarrollarse; capacidad de vivir.

El término "xenogénico" como se utiliza en este documento se refiere a células o tejidos derivados de individuos de diferentes especies que incluyen, pero no están limitadas a, porcino, bovino, caprino, equino, canino, lupino, felino y/o mamíferos no humanos, tales como, pero no limitados a, ballenas y marsopas.

IMPLANTES QUE CONTIENEN MATRIZ DESCELULARIZADA

Las modalidades de la presente invención incluyen implantes que tienen una matriz descelularizada y, opcionalmente, células tejidogénicas exógenas, factores de crecimiento y un portador. De acuerdo con algunas modalidades, el implante está en la forma de una lámina. De acuerdo con algunas modalidades, el implante está en forma particulada. De acuerdo con algunas modalidades, el implante está en la forma de una pasta, gel o suspensión espesa. De acuerdo con algunas modalidades, el implante es inyectable. De acuerdo con algunas modalidades, el implante está en una forma pre-formada, seca. De acuerdo con algunas modalidades, el implante está en una forma porosa. De acuerdo con algunas modalidades, el implante está en una forma fibrosa. De acuerdo con algunas modalidades, el implante llena un hueco en un tejido. De acuerdo con algunas modalidades, el implante es un agente de carga.

De acuerdo con algunas modalidades, el implante es un andamio para el suministro de factores inductivos del crecimiento. De acuerdo con algunas modalidades, el implante es inductivo del crecimiento. De acuerdo con algunas modalidades, el implante es un andamio para el suministro de células. De acuerdo con algunas modalidades, el implante es un andamio para las células de migración. De acuerdo con algunas modalidades, el implante es un medio

conductivo del crecimiento para el crecimiento hacia adentro de tejido.

Tejido Acelular Configurado

De acuerdo con algunas modalidades de la presente invención, los tejidos descelularizados configurados (también referidos en este documento como "tejidos acelulares configurados") incluyen estructuras configuradas tridimensionales que se forman por medio de un proceso en el cual los tejidos acelulares se rompen en componentes más pequeños (por ejemplo, por medio de la molienda u homogenización), luego se reforman en una estructura tridimensional que es diferente del tejido fuente. Todos los tipos de tejidos suaves planteados en la presente solicitud se pueden utilizar, ya sea solos o en combinación entre sí. Los tipos de tejidos pueden ser aloinjertos, autoinjertos o xenoinjertos. Los tejidos acelulares adecuados se pueden preparar utilizando métodos dados a conocer en la presente solicitud. Los tejidos ejemplares que son adecuados para la formación de tejidos acelulares configurados de acuerdo con modalidades de la presente invención incluyen tejidos adiposos descelularizados, deslipidados y tejidos dérmicos descelularizados, deslipidados.

De acuerdo con algunas modalidades de la presente

invención, los tejidos acelulares se manipulan mecánica o químicamente en una forma particulada, la cual se puede resuspender en un líquido (por ejemplo, agua o una solución amortiguadora) para formar una masa fluida, tal como una suspensión espesa. La masa fluida se puede verter en un molde de una forma deseada, en el cual puede formar un tejido acelular configurado poroso o similar a una esponja. De acuerdo con algunas modalidades, el líquido y las partículas de tejido acelular se manipulan para formar una mascarilla, la cual luego se puede moldear en una configuración deseada. De acuerdo con algunas modalidades, el líquido y las partículas de tejido acelular se manipulan para formar una pasta. De acuerdo con algunas modalidades, el líquido y las partículas de tejido acelular se manipulan para formar un gel. De acuerdo con algunas modalidades, el gel se forma durante el proceso utilizado para deslipidizar y descelularizar el tejido. De acuerdo con algunas modalidades, las partículas de tejido acelular se mezclan con un polímero para formar una pasta o una mascarilla. De acuerdo con algunas modalidades, el tejido acelular configurado poroso o similar a una esponja se forma al secar la suspensión, pasta o gel. De acuerdo con algunas modalidades, el tejido acelular configurado poroso o similar a una esponja se forma al liofilizar la suspensión espesa, pasta o gel. De acuerdo con algunas modalidades, la

porosidad del tejido acelular configurado se controla seleccionando la cantidad de líquido en relación con la cantidad de partículas de tejido acelular particulado. De acuerdo con algunas modalidades, el material acelular configurado poroso o similar a una esponja es una pieza sólida que se adapta a la configuración del molde después de ser secado.

De acuerdo con algunas modalidades, el tejido acelular configurado es formado por uno o más de los procesos de moldeo de una suspensión espesa, pasta o gel, labrado de un tejido acelular configurado similar a una esponja en una configuración diferente, el uso de la impresión tridimensional ("3-D") para depositar una suspensión espesa, pasta o gel fluido en una configuración tridimensional, laminación de piezas de tejido acelular configurado y otras tecnologías conocidas para el uso en la configuración de objetos tridimensionales a partir de materiales suaves o fluidos. De acuerdo con algunas modalidades, los materiales acelulares configurados se pueden proporcionar en una forma liofilizada, crioconservada o congelada.

De acuerdo con algunas modalidades de la presente invención, los tejidos acelulares configurados se pueden utilizar para reparar quirúrgicamente defectos en un paciente. De acuerdo con algunas modalidades, los tejidos

acelulares configurados se utilizan solos o después de ser sembrados o cultivados con células tejidogénicas exógenas apropiadas. De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, las células pueden ser ya sea autólogas o alogénicas, o una mezcla de células autólogas y alogénicas. De acuerdo con algunas modalidades, los tejidos acelulares configurados son provistos con sustancias tales como factores de crecimiento, proteínas, factores angiogénicos y/o nanotubos/nanopartículas de liberación controlada que secretan preferentemente factores para procesos específicos. De acuerdo con algunas modalidades, las sustancias se agregan a la suspensión espesa, pasta o gel antes de que se forme el tejido acelular configurado. De acuerdo con algunas modalidades, las sustancias se agregan al tejido acelular configurado después de que se forma.

De acuerdo con algunas modalidades de la presente invención, el perfil de degradación del tejido acelular configurado y una sustancia en el mismo causa que la sustancia se libere en un tiempo apropiado para que ocurre el crecimiento o la curación de tejidos. Un ejemplo de esto sería promover la formación de vasculatura necesaria para suministrar células dentro de o adyacente a un tejido acelular configurado con nutrientes. En este ejemplo, los factores específicos, células, y otras sustancias, si es necesario, se pueden proporcionar en ubicaciones

seleccionadas en el tejido acelular configurado para promover la angiogénesis en las ubicaciones deseadas. Se pueden incluir otros factores que no proporcionan la angiogénesis, de tal manera que la vasculatura se forme solo donde se desea. Como un ejemplo más específico, la creación de un riñón utilizando un tejido acelular configurado incluiría estos factores y células necesarios para crear preferentemente la arquitectura para arterias renales, venas renales, un uréter y otras cualidades de un riñón funcional.

De acuerdo con algunas modalidades de la presente invención, los tejidos acelulares configurados tienen configuraciones simples. De acuerdo con algunas modalidades, los tejidos acelulares configurados tienen configuraciones complejas. De acuerdo con algunas modalidades, los tejidos acelulares configurados tienen configuraciones simétricas. De acuerdo con algunas modalidades, los tejidos acelulares configurados tienen configuraciones asimétricas. De acuerdo con algunas modalidades, los tejidos acelulares configurados tienen configuraciones similares a las configuraciones de estructuras anatómicas. De acuerdo con algunas modalidades, los tejidos acelulares configurados tienen las configuraciones de órganos anatómicos.

De acuerdo con algunas modalidades, los tejidos

acelulares configurados se proporcionan para el uso ex vivo. De acuerdo con algunas modalidades, los tejidos acelulares configurados se proporcionan para el uso in vivo (es decir, para el implante). De acuerdo con algunas modalidades, los tejidos acelulares configurados tienen porosidades adaptadas para su uso pretendido. De acuerdo con algunas modalidades de la presente invención, los tejidos acelulares configurados tienen un pH adaptado para su uso pretendido. De acuerdo con algunas modalidades, los tejidos acelulares configurados incluyen colágeno reticulado. De acuerdo con algunas modalidades de la presente invención, los tejidos acelulares configurados incluyen componentes diferentes de colágeno reticulados. De acuerdo con algunas modalidades, los tejidos acelulares configurados tienen polímeros biológicos que son reticulados con polímeros no biológicos (es decir, sintéticos).

De acuerdo con algunas modalidades de la presente invención, un método para formar un tejido acelular configurado incluye un paso que consiste en explorar o capturar imágenes de una porción del cuerpo de un paciente (por ejemplo, una porción de la cara de un paciente u otra estructura anatómica), luego hacer tejidos acelulares configurados para reemplazar esas estructuras anatómicas. En otras modalidades, un tejido acelular configurado se

hace para restaurar la configuración de una estructura anatómica. En otras modalidades, un tejido acelular configurado se hace para proporcionar un sustituto para una estructura anatómica faltante.

De acuerdo con algunas modalidades de la presente invención, el tejido acelular configurado se forma, luego se cultiva in vitro con células exógenas. Cuando las células alcanzan un número suficiente, el tejido acelular configurado se implanta para la cirugía plástica y/o reconstructiva.

De acuerdo con algunas modalidades de la presente invención, el tejido acelular configurado se forma, luego se cultiva in vitro con células. Cuando las células alcanzan un número suficiente, la composición es crioconservada y luego se reconstituye cuando es necesaria para el uso.

De acuerdo con una modalidad de la presente invención, las células madre mesenquimales se recolectan de un paciente necesitado de un injerto nasal, se cultivan sobre un tejido acelular configurado que se asemeja a la estructura nasal propia del paciente. Después de que las células se han diferenciado en un número suficiente de condrocitos, el tejido acelular configurado se puede proporcionar al paciente como un injerto viable.

De acuerdo con una modalidad de la presente

invención, un tejido acelular configurado se proporciona en una forma liofilizada. El tejido acelular configurado liofilizado se rehidrata en la sala de operaciones, donde se puede combinar con sustancias tales como plasma rico en plaquetas del paciente (PRP), células autólogas tales como aquellas obtenidas de la médula ósea del paciente o una fracción vascular estromal (SVF) (por ejemplo, SVF de tejido adiposo obtenido por medio de la liposucción), células alogénicas tales aquellas obtenidas de un banco de células (por ejemplo, células madre, células progenitoras u otros tipos de células disponibles de bancos de células) o médula ósea y componentes de médula ósea que incluyen células de médula ósea (tanto autólogas como alogénicas).

Las modalidades de la presente invención incluyen métodos para hacer las diversas modalidades de los tejidos acelulares configurados descritos anteriormente. Las modalidades de estos métodos serán obvias para aquellas personas que tienen experiencia ordinaria en el campo y la posesión de la presente descripción.

Matriz Descelularizada

De acuerdo con un aspecto, la invención descrita proporciona una matriz descelularizada (también referida en este documento como una “matriz acelular”) derivada de un tejido biológico y que es adecuada para el implante en un

paciente. La matriz descelularizada comprende ECM de la cual se han removido células y fragmentos de células no deseados. De acuerdo con una modalidad, el tejido es autólogo para el paciente. De acuerdo con otra modalidad, el tejido es alogénico para el paciente. De acuerdo con todavía otra modalidad, el tejido es xenogénico para el paciente.

De acuerdo con una modalidad, el tejido se selecciona del grupo que consiste de un tejido adiposo, tejido amniótico, tejido arterial, tejido de cartílago, tejido conectivo, tejido coriónico, tejido colónico, tejido dental no calcificado, tejido dérmico, tejido duodenal, tejido endotelial, tejido epitelial, tejido facial, tejido gastrointestinal, tejido gingival, tejido de placa de crecimiento, tejido de discos intervertebrales, tejido de la mucosa intestinal, tejido seroso intestinal, tejido de ligamentos, tejido de hígado, tejido de pulmones, tejido mamario, tejido membranoso, tejido de meniscos, tejido muscular, tejido nervioso, tejido ovárico, tejido de órganos parenquimales, tejido pericárdico, tejido perióstio, tejido peritoneal, tejido placentario, tejido de piel, tejido de vaso, tejido estomacal, tejido sinovial, tejido de tendones, tejido de testículos, tejido del cordón umbilical, tejido urológico, tejido vascular, tejido venoso, otros tejidos no calcificados y una combinación de

los mismos.

De acuerdo con una modalidad, la fuente del tejido es un donador mamífero. De acuerdo con una modalidad, la fuente del tejido es un donador humano. De acuerdo con una modalidad, el donador humano es un donador vivo. De acuerdo con otra modalidad, el donador humano es un donador cadavérico. De acuerdo con todavía otra modalidad, el donador de tejido es el receptor propuesto de la matriz acelular.

Tejido Adiposo

De acuerdo con algunas modalidades, el tejido comprende un tejido adiposo derivado de una región del cuerpo rica en tejido adiposo.

De acuerdo con algunas modalidades, la región del cuerpo rica en tejido adiposo se selecciona del grupo que consiste de un abdomen, cadera, región hipodérmica de la piel, almohadilla plana infrarrotuliana, rodilla, órgano mamario, muslo y una combinación de los mismos.

De acuerdo con algunas modalidades, el tejido es un tejido adiposo seleccionado del grupo que consiste de un tejido adiposo visceral, un tejido adiposo hipodérmico y una combinación de los mismos. De acuerdo con algunas modalidades, el tejido es un tejido adiposo que comprende un tejido adiposo visceral. De acuerdo con algunas

modalidades, el tejido es un tejido adiposo que comprende un tejido adiposo subcutáneo.

De acuerdo con una modalidad, la fuente del tejido es un donador mamífero. De acuerdo con algunas modalidades, el tejido es un tejido adiposo derivado de una región del cuerpo rica en tejido adiposo de un donador humano. De acuerdo con algunas modalidades, el donador humano es un donador cadavérico. De acuerdo con algunas modalidades, el donador humano es un donador vivo.

De acuerdo con una modalidad, el tejido es un tejido adiposo derivado de un tejido adiposo autólogo. De acuerdo con una modalidad, el tejido es un tejido adiposo que comprende un tejido adiposo derivado de un tejido adiposo alogénico. De acuerdo con una modalidad, el tejido es un tejido adiposo que comprende un tejido adiposo derivado de un tejido adiposo xenogénico.

Tejido de Cartílago

De acuerdo con algunas modalidades, el tejido comprende un tejido de cartílago seleccionado del grupo que consiste de un tejido de cartílago hialino, tejido de fibrocartílago, tejido de cartílago elástico y una combinación de los mismos. De acuerdo con algunas modalidades, el tejido comprende un tejido de cartílago hialino. De acuerdo con algunas modalidades, el tejido

comprende un tejido de cartílago fibrocartilaginoso. De acuerdo con algunas modalidades, el tejido comprende un tejido de cartílago elástico.

De acuerdo con algunas modalidades, el tejido comprende un tejido de cartílago derivado de un órgano cartilaginoso o por lo menos un fragmento del mismo.

De acuerdo con algunas modalidades, el órgano cartilaginoso se selecciona del grupo que consiste de un órgano de cartílago articular, bronquio, placa de crecimiento, disco intervertebral, laringe, menisco, nariz, tráquea y una combinación de los mismos.

De acuerdo con una modalidad, la fuente del tejido es un donador mamífero. De acuerdo con algunas modalidades, el tejido comprende un tejido de cartílago derivado de un donador humano. De acuerdo con algunas modalidades, el donador humano es un donador cadavérico. De acuerdo con algunas modalidades, el donador humano es un donador vivo.

De acuerdo con una modalidad, el tejido es un tejido de cartílago derivado de un tejido de cartílago autólogo. De acuerdo con una modalidad, el tejido es un tejido de cartílago derivado de un tejido de cartílago alogénico. De acuerdo con una modalidad, el tejido es un tejido de cartílago derivado de un tejido de cartílago xenogénico.

Tejido Dental no Calcificado

De acuerdo con algunas modalidades, el tejido comprende un tejido dental no calcificado. De acuerdo con algunas modalidades de este tipo, el tejido comprende un tejido de pulpa dental.

De acuerdo con algunas modalidades, el tejido comprende un tejido de pulpa dental derivado de por lo menos un diente. De acuerdo con algunas modalidades, el tejido comprende un tejido de pulpa dental derivado de una pluralidad de dientes.

De acuerdo con algunas modalidades, el diente se selecciona del grupo que consiste de un diente de leche, un diente permanente y una combinación de los mismos. De acuerdo con algunas modalidades, el diente es un diente de leche. De acuerdo con algunas modalidades, el diente es un diente permanente.

De acuerdo con una modalidad, la fuente del tejido es un tejido de pulpa dental derivado de un donador mamífero. De acuerdo con algunas modalidades, el tejido es un tejido de pulpa dental derivado de un donador humano. De acuerdo con algunas modalidades, el donador humano es un donador cadavérico. De acuerdo con algunas modalidades, el donador humano es un donador vivo.

De acuerdo con una modalidad, el tejido es un tejido de pulpa dental autólogo. De acuerdo con una

modalidad, el tejido es un tejido de pulpa dental alogénico. De acuerdo con una modalidad, el tejido es un tejido de pulpa dental xenogénico.

Tejido Epitelial

De acuerdo con algunas modalidades, el tejido comprende un tejido epitelial seleccionado del grupo que consiste de un tejido epitelial cutáneo, un tejido epitelial mucoso, un tejido epitelial seroso y una combinación de los mismos. De acuerdo con algunas modalidades, el tejido comprende un tejido de membrana basal.

De acuerdo con algunas modalidades, el tejido comprende un tejido epitelial derivado de un órgano epitelial o por lo menos un fragmento del mismo.

De acuerdo con algunas modalidades, el tejido epitelial se selecciona del grupo que consiste de un revestimiento gastrointestinal, revestimiento de la mucosa intestinal, revestimiento seroso intestinal, revestimiento pericárdico, revestimiento peritoneo, revestimiento pleural, revestimiento reproductivo, revestimiento respiratorio y revestimiento urinario.

De acuerdo con algunas modalidades, el revestimiento gastrointestinal se selecciona del grupo que consiste de un revestimiento de duodeno, revestimiento de

esófago, revestimiento de ílio, revestimiento de yeyuno, revestimiento de intestino grueso, revestimiento de boca, revestimiento de faringe, revestimiento de intestino delgado, revestimiento de estómago y combinaciones de los mismos.

De acuerdo con algunas modalidades, el órgano epitelial se selecciona del grupo que consiste de un órgano gastrointestinal, un órgano respiratorio, un órgano urológico y una combinación de los mismos.

De acuerdo con algunas modalidades, el órgano gastrointestinal se selecciona del grupo que consiste de un duodeno, esófago, íleo, yeyuno, intestino grueso, boca, encía, intestino delgado, estómago y una combinación de los mismos.

De acuerdo con algunas modalidades, el órgano respiratorio se selecciona del grupo que consiste de bronquios, diafragma, corazón, laringe, pulmón, boca, nariz, faringe, tráquea y una combinación de los mismos.

De acuerdo con algunas modalidades, el órgano urológico se selecciona del grupo que consiste de una glándula adrenal, epidídimo, riñón, ovario, pene, glándula prostática, vesícula seminal, testículos, uréter, uretra, vejiga urinaria, conducto deferente y una combinación de los mismos.

De acuerdo con algunas modalidades, el órgano

epitelial se selecciona del grupo que consiste en un duodeno, esófago, corazón, íleo, yeyuno, intestino grueso, pulmón, boca, encía, faringe, intestino delgado, piel, estómago y una combinación de los mismos.

De acuerdo con una modalidad, la fuente del tejido es un donador mamífero. De acuerdo con algunas modalidades, el tejido es un tejido epitelial derivado de un donador humano. De acuerdo con algunas modalidades, el donador humano es un donador cadavérico. De acuerdo con algunas modalidades, el donador humano es un donador vivo.

De acuerdo con una modalidad, el tejido es un tejido epitelial derivado de un tejido epitelial autólogo. De acuerdo con una modalidad, el tejido es un tejido epitelial derivado de un tejido epitelial alogénico. De acuerdo con una modalidad, el tejido es un tejido epitelial derivado de un tejido epitelial xenogénica.

Tejido Facial

De acuerdo con algunas modalidades, el tejido comprende un tejido facial seleccionado del grupo que consiste de una facia superficial, facia profunda, facia visceral y una combinación de las mismas. El término "facia" como se utiliza en este documento se refiere a una laminilla de tejido conectivo fibroareolar distribuida por todo el cuerpo que rodea órganos delicados.

De acuerdo con algunas modalidades, el tejido comprende un tejido facial derivado de una parte del cuerpo rica en facia o por lo menos un fragmento de la misma. De acuerdo con algunas modalidades, la parte del cuerpo rica en facia se selecciona del grupo que consiste de un brazo, espalda, codo, pie, mano, cabeza, rodilla, pierna, músculo, cuello, piel, muslo, dedo de los pies, muñeca y una combinación de los mismos.

De acuerdo con algunas modalidades, el tejido comprende tejido facial seleccionado del grupo que consiste de una miofacia asociada con un músculo, facia palmar asociada con la palma de una mano, facia plantar asociada con la planta de un pie, facia toracolumbar asociada con la espalda, facias lata asociadas con un muslo, facia lata tensora asociada con tejido de tendón y una combinación de los mismos.

De acuerdo con una modalidad, la fuente del tejido es un donador mamífero. De acuerdo con algunas modalidades, el tejido comprende un tejido facial derivado de un donador humano. De acuerdo con algunas modalidades, el donador humano es un donador cadavérico. De acuerdo con algunas modalidades, el donador humano es un donador vivo.

De acuerdo con una modalidad, el tejido es un tejido facial derivado de una facia autóloga. De acuerdo con una modalidad, el tejido es un tejido facial derivado

de una facia alogénica. De acuerdo con una modalidad, el tejido es un tejido facial derivado de una facia xenogénico.

Tejido de Ligamento

De acuerdo con algunas modalidades, el tejido comprende un tejido de ligamento seleccionado del grupo que consiste de un ligamento capsular, ligamento extra-capsular, ligamento intracapsular, ligamento cruzado y una combinación de los mismos. El término "ligamento" como se utiliza en este documento se refiere a una banda o lámina de tejido fibroso que conecta dos o más huesos, cartílagos u otras estructuras, o que sirve como soporte para facias o músculos y un pliegue de peritoneo que sostiene cualquiera de las vísceras abdominales.

De acuerdo con algunas modalidades, el tejido comprende un tejido de ligamento derivado de una parte del cuerpo rica en ligamento o por lo menos un fragmento de la misma. De acuerdo con algunas modalidades, la parte del cuerpo rica en ligamento se selecciona del grupo que consiste de un brazo, codo, pie, mano, cabeza, rodilla, pierna, cuello, pelvis, falange, tórax, dedo del pie, muñeca y una combinación de los mismos.

De acuerdo con algunas modalidades, el tejido comprende un tejido de ligamento derivado de un órgano de

ligamento o un fragmento del mismo. De acuerdo con algunas modalidades, el órgano de ligamento se selecciona del grupo que consiste de una articulación, boca, rótula y una combinación de los mismos.

De acuerdo con una modalidad, la fuente del tejido es un donador mamífero. De acuerdo con algunas modalidades, el tejido comprende un tejido de ligamento derivado de un donador humano. De acuerdo con algunas modalidades, el donador humano es un donador cadavérico. De acuerdo con algunas modalidades, el donador humano es un donador vivo.

De acuerdo con una modalidad, el tejido es un tejido de ligamento derivado de un ligamento autólogo. De acuerdo con una modalidad, el tejido es un tejido de ligamento derivado de un tejido de ligamento alogénico. De acuerdo con una modalidad, el tejido es un tejido de ligamento derivado de un tejido de ligamento xenogénico.

Tejido Mamario

De acuerdo con algunas modalidades, el tejido comprende un tejido mamario derivado de un órgano mamario o por lo menos un fragmento del mismo.

De acuerdo con una modalidad, la fuente del tejido es un donador mamífero. De acuerdo con algunas modalidades, el tejido es un órgano mamario de un donador

humano. De acuerdo con algunas modalidades, el donador humano es un donador cadavérico. De acuerdo con algunas modalidades, el donador humano es un donador vivo.

De acuerdo con una modalidad, el tejido es un tejido mamario derivado de un órgano mamario autólogo. De acuerdo con una modalidad, el tejido es un tejido mamario derivado de un órgano mamario alogénico. De acuerdo con una modalidad, el tejido es un tejido mamario derivado de un órgano mamario xenogénico.

Tejido Muscular

De acuerdo con algunas modalidades, el tejido comprende un tejido muscular seleccionado del grupo que consiste de un tejido de músculo cardíaco, un tejido de músculo esquelético, un tejido de músculo liso y una combinación de los mismos.

De acuerdo con algunas modalidades, el tejido es un tejido muscular derivado de un órgano rico en tejido muscular o por lo menos un fragmento del mismo.

De acuerdo con algunas modalidades, el órgano rico en tejido muscular se selecciona del grupo que consiste de un órgano gastrointestinal, órgano esquelético, corazón y una combinación de los mismos.

De acuerdo con una modalidad, la fuente del tejido es un donador mamífero. De acuerdo con algunas

modalidades, el tejido comprende un tejido muscular derivado de un donador humano. De acuerdo con algunas modalidades, el donador humano es un donador cadavérico. De acuerdo con algunas modalidades, el donador humano es un donador vivo.

De acuerdo con una modalidad, el tejido comprende un tejido muscular derivado de un tejido muscular autólogo. De acuerdo con una modalidad, el tejido comprende un tejido muscular derivado de un tejido muscular alogénico. De acuerdo con una modalidad, el tejido comprende un tejido muscular derivado de un tejido muscular xenogénico.

Tejido Nervioso

De acuerdo con algunas modalidades, el tejido comprende un tejido nervioso derivado de un órgano rico en tejido nervioso o por lo menos un fragmento del mismo.

De acuerdo con algunas modalidades, el órgano rico en tejido nervioso se selecciona del grupo que consiste de un cerebro, médula espinal y una combinación de los mismos.

De acuerdo con una modalidad, la fuente del tejido es un donador mamífero. De acuerdo con algunas modalidades, el tejido es un tejido nervioso derivado de un donador humano. De acuerdo con algunas modalidades, el donador humano es un donador cadavérico.

De acuerdo con una modalidad, el tejido comprende un tejido nervioso derivado de un tejido nervioso autólogo. De acuerdo con una modalidad, el tejido comprende un tejido nervioso derivado de un tejido nervioso alogénico. De acuerdo con una modalidad, el tejido comprende un tejido nervioso derivado de un tejido nervioso xenogénico.

Tejido Placentario

De acuerdo con algunas modalidades, el tejido comprende un tejido placentario seleccionado del grupo que consiste de un tejido amniótico, tejido coriónico, tejido de cordón umbilical y una combinación de los mismos.

De acuerdo con algunas modalidades, el tejido comprende un tejido placentario derivado de un órgano placentario aislado o por lo menos un fragmento del mismo. De acuerdo con algunas modalidades, el órgano placentario se selecciona del grupo que consiste de un amnios, corion, cordón umbilical, placenta y una combinación de los mismos.

De acuerdo con una modalidad, el tejido comprende un tejido placentario derivado de un tejido placentario autólogo. De acuerdo con una modalidad, el tejido comprende un tejido placentario derivado de un tejido placentario alogénico. De acuerdo con una modalidad, el tejido comprende un tejido placentario derivado de un tejido placentario xenogénico.

De acuerdo con una modalidad, el tejido es un cordón umbilical derivado de un cordón umbilical autólogo. De acuerdo con una modalidad, el tejido es un tejido de cordón umbilical derivado de un cordón umbilical alogénico. De acuerdo con una modalidad, el tejido es un tejido de cordón umbilical derivado de un cordón umbilical xenogénico.

Tejido de Piel

De acuerdo con algunas modalidades, el tejido comprende un tejido de piel seleccionado del grupo que consiste de un tejido epidérmico, tejido dérmico, tejido de membrana basal y una combinación de los mismos.

De acuerdo con una modalidad, la fuente del tejido es un donador mamífero. De acuerdo con algunas modalidades, el tejido de piel se deriva de un donador humano. De acuerdo con algunas modalidades, el donador humano es un donador cadavérico. De acuerdo con algunas modalidades, el donador humano es un donador vivo.

De acuerdo con una modalidad, el tejido comprende un tejido de piel derivado de un tejido de piel autólogo. De acuerdo con una modalidad, el tejido comprende un tejido de piel derivado de un tejido de piel alogénico. De acuerdo con una modalidad, el tejido comprende un tejido de piel derivado de un tejido de piel xenogénico.

Tejido Vascular

El término “vasculatura” o “tejido vascular” como se utiliza en este documento se refiere a la red vascular de una parte del cuerpo y su ordenación. La red vascular comprende vasos sanguíneos, es decir cualquier vaso que transporte sangre: arterias, arteriolas, vasos capilares, vénulas y venas. Una arteria es un vaso pulsátil muscular, de pared relativamente gruesa que transporta sangre lejos del corazón. Una vena es un vaso sanguíneo que lleva sangre hacia el corazón. Tanto las arterias como las venas comprenden tres capas: la túnica íntima, la túnica media y la túnica adventicia. Las venas también contienen válvulas que impiden el reflujo de sangre. La túnica íntima, una capa individual de células endoteliales escamosas simples aglutinadas por una matriz intercelular de polisacáridos, rodeada por una capa delgada de tejido conectivo subendotelial entrelazado con una variedad de bandas elásticas dispuestas de manera circular llamada la lámina elástica interna; una túnica media, que comprende fibra elástica dispuesta de manera circular, tejido conectivo, sustancias de polisacáridos y una banda elástica gruesa llamada la lámina elástica externa, y la túnica adventicia, hecha completamente de tejido conectivo. Los tubos capilares comprenden una capa de endotelio y tejido conectivo.

De acuerdo con algunas modalidades, el tejido comprende tejido vascular. De acuerdo con algunas modalidades, el tejido vascular se deriva de un donador mamífero. De acuerdo con algunas modalidades, el tejido vascular se deriva de un donador humano. De acuerdo con algunas modalidades, el tejido vascular se deriva de un donador cadavérico. De acuerdo con algunas modalidades, el tejido vascular se deriva de un donador vivo.

De acuerdo con una modalidad, el tejido es un tejido vascular derivado de un tejido vascular autólogo. De acuerdo con una modalidad, el tejido es un tejido vascular derivado de un tejido vascular alogénico. De acuerdo con una modalidad, el tejido es un tejido vascular derivado de un tejido vascular xenogénico.

Matriz Sembrada con Células Tejidogénicas

De acuerdo con algunas modalidades de la presente invención, la matriz se siembra con por lo menos una población viable de células tejidogénicas. Por lo menos la población viable de células tejidogénicas se pueden derivar de uno o más de los tipos de tejido de los cuales se puede derivar la matriz. Estos tipos de tejido se identifican anteriormente con respecto al planteamiento de la matriz acelular.

De acuerdo con una modalidad, por lo menos la

población viable de células tejidogénicas se selecciona del grupo que consiste de una población viable de células madre pluripotentes, una población viable de células madre mesenquimales, una población viable de células madre derivadas de tejido y una población viable de células progenitoras derivadas de tejido.

De acuerdo con una modalidad, por lo menos la población viable de células tejidogénicas secreta por lo menos un factor inductivo del crecimiento.

De acuerdo con una modalidad, por lo menos la población viable de células tejidogénicas se puede reprogramar a por lo menos una población viable de células madre pluripotentes inducidas (iPSC).

De acuerdo con una modalidad, por lo menos la población viable de células tejidogénicas es capaz de diferenciarse en células de por lo menos un linaje embriogénico. De acuerdo con una modalidad, el linaje embriogénico se selecciona del grupo que consiste de un linaje ectodérmico, un linaje mesodérmico y un linaje endodérmico.

De acuerdo con una modalidad, por lo menos la población viable de células tejidogénicas es capaz de regenerar un tejido objetivo. De acuerdo con una modalidad, el tejido objetivo se selecciona del grupo que consiste de un tejido adiposo, tejido amniótico, tejido arterial,

tejido óseo, tejido de cartílago, tejido de corion, tejido de colon, tejido dental, tejido dérmico, tejido duodenal, tejido endotelial, tejido epitelial, tejido gastrointestinal, tejido gingival, tejido de placa de crecimiento, tejido de discos intervertebrales, tejido de la mucosa intestinal, tejido seroso intestinal, tejido de riñón, tejido de ligamento, tejido de hígado, tejido de pulmón, tejido de menisco, tejido muscular, tejido nervioso, tejido ovárico, tejido pancreático, tejido de órganos parenquimales, tejido pericárdico, tejido de perióstio, tejido peritoneo, tejido de piel, tejido de vaso, tejido sinovial, tejido de tendón, tejido de testículos, tejido urológico, tejido vascular, tejido venoso y una combinación de los mismos.

De acuerdo con una modalidad, por lo menos la población viable de células tejidogénicas es capaz de diferenciarse en un linaje de células de tejido objetivo. De acuerdo con una modalidad, el linaje de células de tejido objetivo se selecciona del grupo que consiste de un linaje de células adiposas, linaje de células amnióticas, linaje de células arteriales, linaje de células óseas, linaje de células de cartílago, linaje de células dentales, linaje de células dérmicas, linaje de células duodenales, linaje de células endoteliales, linaje de células epiteliales, linaje de células gastrointestinales, linaje

de células de placa de crecimiento, linaje de células de discos intervertebrales, linaje de células de la mucosa intestinal, linajes de células serosas intestinales, linaje de células de riñón, linaje de células de ligamento, linaje de células de hígado, linaje de células de pulmón, linaje de células de menisco, linaje de células musculares, linaje de células nerviosas, linaje de células de ovario, linaje de células pancreáticas, linaje de células de órganos parenquimales, linaje de células pericardíacas, linaje de células del periostio, linaje de células peritoneas, linaje de células de piel, linaje de células de vaso, linaje de células sinoviales, linaje de células de tendón, linaje de células de testículos, linaje de células urológicas, linaje de células vasculares, linaje de células venosas y una combinación de los mismos.

De acuerdo con una modalidad, por lo menos la población viable de células tejidogénicas derivadas de tejido adiposo se diferencia a lo largo de un linaje osteogénico. De acuerdo con una modalidad, por lo menos la población viable de células tejidogénicas derivadas de tejido adiposo se diferencia a lo largo de un linaje adipogénico. De acuerdo con una modalidad, por lo menos la población viable de células tejidogénicas derivadas de tejido adiposo se diferencia a lo largo de un linaje condrogénico. De acuerdo con una modalidad, por lo menos la

población viable de células tejidogénicas derivadas de tejido adiposo se diferencia a lo largo de un linaje neurogénico.

De acuerdo con una modalidad, por lo menos la población viable de células tejidogénicas es capaz de emigrar de o a por lo menos la matriz conductiva de crecimiento, de acuerdo con una modalidad, por lo menos la población viable de células tejidogénicas comprende una población no expandida viable de células tejidogénicas. De acuerdo con una modalidad, por lo menos la población viable de células tejidogénicas comprende una población expandida viable de células tejidogénicas. De acuerdo con algunas modalidades, por lo menos la población viable de células tejidogénicas adherentes a y residentes en el medio ambiente endógeno de la matriz conductiva de crecimiento está privilegiada inmunológicamente. El término "privilegiado inmunológicamente" como se utiliza en este documento se refiere a la característica de células tejidogénicas por medio de la cual no hay una inducción de una respuesta inmune con el trasplante de estas células.

Frecuencia de Células Tejidogénicas

De acuerdo con algunas modalidades, por lo menos la población viable de células tejidogénicas comprende una frecuencia relativa sustancialmente similar a la población

total de células de la matriz conductiva de crecimiento. De acuerdo con algunas modalidades, por lo menos la población viable de células tejidogénicas comprende una frecuencia relativa sustancialmente más alta que la población total de células de la matriz conductiva de crecimiento.

De acuerdo con algunas modalidades, por lo menos la población viable de células tejidogénicas comprende por lo menos aproximadamente 10,000 células tejidogénicas por cc de implante. De acuerdo con algunas modalidades, por lo menos la población viable de células tejidogénicas comprende por lo menos aproximadamente 20,000 células tejidogénicas por cc de implante. De acuerdo con algunas modalidades, por lo menos la población viable de células tejidogénicas comprende por lo menos aproximadamente 30,000 células tejidogénicas por cc de implante. De acuerdo con algunas modalidades, por lo menos la población viable de células tejidogénicas comprende por lo menos aproximadamente 40,000 células tejidogénicas por cc de implante. De acuerdo con algunas modalidades, por lo menos la población viable de células tejidogénicas comprende por lo menos aproximadamente 50,000 células tejidogénicas por cc de implante.

Componente Inductivo del Crecimiento

De acuerdo con algunas modalidades, la matriz

comprende además por lo menos un componente inductivo del crecimiento. De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, el componente inductivo del crecimiento es por lo menos una citocina. De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, por lo menos el componente inductivo del crecimiento comprende por lo menos un factor de crecimiento. De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, por lo menos el factor de crecimiento es el factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2). De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, por lo menos el factor de crecimiento es el factor de crecimiento de fibroblastos-5 (FGF-5). De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, por lo menos el factor de crecimiento es el factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1). De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, por lo menos el factor de crecimiento es el factor de crecimiento transdérmico-beta (TGF-β). De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, por lo menos el factor de crecimiento es la proteína morfogénica ósea-2 (BMP-2). De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, por lo menos el factor de crecimiento es la proteína morfogénica ósea-7 (BMP-7). De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, por lo menos el factor de crecimiento es el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, por lo menos el factor de

crecimiento es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, por lo menos el factor de crecimiento es el factor de crecimiento epidérmico neural-similar 1 (NELL-1).

De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, por lo menos el componente inductivo del crecimiento es una matriz ósea desmineralizada (DBM). De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, la DBM es un hueso autólogo desmineralizado. De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, la DBM es hueso alogénico desmineralizado. De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, la DBM es hueso xenogénico desmineralizado. De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, la DBM se deriva por medio de la desmineralización de hueso poroso. De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, la DBM se deriva por medio de la desmineralización de hueso cortical (es decir, hueso cortical desmineralizado o DCB). De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, la DBM tiene un contenido de minerales residuales de 8% o menos (p/p). De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, la DBM tiene un contenido de minerales residuales de 5% o menos (p/p). De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, la DBM tiene un contenido de minerales residuales de 2% o menos (p/p). De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, la DBM tiene un contenido de minerales residuales de 1% o menos (p/p). De acuerdo con

algunas modalidades de ese tipo, la DBM tiene un contenido de minerales residuales de 0.5% o menos (p/p). De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, la DBM consiste esencialmente de colágeno, proteínas diferentes de colágeno tales como factores de crecimiento y otras sustancias no minerales encontradas en el hueso original, aunque no necesariamente en las cantidades originales. De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, el hueso desmineralizado está en la forma de fibras de hueso desmineralizado (por ejemplo, partículas alargadas de DBM que tienen dimensiones mínimas en el orden de un micrómetro a cientos de micrómetros y una dimensión máxima en el orden de un milímetro a cientos de milímetros).

De acuerdo con algunas modalidades, el implante comprende además por lo menos un crioconservador. De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, por lo menos el crioconservador es una solución. De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, el crioconservador es sulfóxido de dimetilo (DMSO). De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, el crioconservador es una solución de medios basales que comprende aproximadamente 5% de DMSO. De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, el crioconservador es solución de medios basales que comprende aproximadamente 10% de DMSO. De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, el crioconservador es solución de medios basales que

comprende aproximadamente 15% de DMSO. De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, el crioconservador es suero bovino fetal que comprende aproximadamente 5% de DMSO. De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, el crioconservador es suero bovino fetal que comprende aproximadamente 10% de DMSO. De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, el crioconservador es un suero que comprende aproximadamente 15% de DMSO. De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, el crioconservador es suero humano que comprende aproximadamente 5% de DMSO. De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, el crioconservador es suero humano que comprende aproximadamente 10% de DMSO. De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, el crioconservador es etilenglicol. De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, el crioconservador es propilenglicol. De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, el crioconservador es glicerol.

MÉTODO PARA FABRICAR UNA MATRIZ DERIVADA DE TEJIDO SUAVE ACELULAR

Con referencia a la FIGURA 1, de acuerdo con otro aspecto, la invención descrita proporciona un método para fabricar un implante, el método comprende uno o más de los pasos que consisten en:

(a) aislar una muestra de un tejido suave de su fuente;

(b) procesar previamente el tejido suave;

(c) deslipidizar el tejido suave;

(d) descelularizar el tejido suave;

(e) desinfectar el tejido suave;

(f) procesar posteriormente el tejido suave; y

(g) empacar el tejido suave.

En varias modalidades del método dado a conocer, algunos de los pasos mencionados anteriormente se pueden omitir, el orden de los pasos se puede variar o se pueden proporcionar pasos adicionales. El "tejido suave" del método puede ser el tejido suave en la forma aislada de la fuente, el tejido suave procesado previamente, el tejido suave deslipidizado, el tejido suave descelularizado (o acelular), el tejido suave desinfectado, el tejido suave procesado posteriormente o el tejido suave empacado. Las modalidades del método dado a conocer se plantean adicionalmente en lo sucesivo y se presentan modalidades ejemplares.

1. Paso de aislamiento (a): aislamiento de una muestra de un tejido suave de su fuente

De acuerdo con algunas modalidades, el paso de aislamiento (a) comprende extirpar la muestra de tejido

suave deseado de su fuente. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de aislamiento (a) comprende retirar la muestra de tejido suave deseado de su fuente. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de aislamiento (a) comprende aspirar la muestra de tejido suave deseado de su fuente. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de aislamiento (a) comprende recuperar la muestra del tejido fuente deseado de su fuente.

De acuerdo con algunas modalidades, el paso de aislamiento (a) comprende separar la muestra de tejido suave deseado de tejidos adyacentes de un tipo diferente del tejido suave deseado. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de aislamiento (a) comprende cortar los tejidos adyacentes de la muestra de tejido suave deseado. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de aislamiento (a) comprende jalar los tejidos adyacentes de la muestra de tejido suave deseado. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de aislamiento (a) comprende raspar tejidos adyacentes de la muestra de tejido suave deseado. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de aislamiento (a) comprende separar los tejidos adyacentes de la muestra de tejido suave deseado por medio del asentamiento diferencial del tejido suave deseado y tejidos adyacentes en un medio líquido.

De acuerdo con algunas modalidades, el tejido

suave deseado es un tejido no calcificado del cuerpo de mamífero. De acuerdo con algunas modalidades, el tejido suave deseado incluye uno o más de un tejido adiposo, tejido amniótico, tejido arterial, tejido de cartílago, tejido conectivo, tejido coriónico, tejido de colon, tejido dental no calcificado, tejido dérmico, tejido duodenal, tejido endotelial, tejido epitelial, tejido facial, tejido gastrointestinal, tejido gingival, tejido de placa de crecimiento, tejido de discos intervertebrales, tejido de la mucosa intestinal, tejido seroso intestinal, tejido de ligamento, tejido de hígado, tejido de pulmón, tejido mamario, tejido membranoso, tejido de menisco, tejido muscular, tejido nervioso, tejido ovárico, tejido de órganos parenquimales, tejido pericardíaco, tejido del periostio, tejido peritoneal, tejido placentario, tejido de piel, tejido de bazo, tejido de estómago, tejido sinovial, tejido de tendón, tejido de testículos, tejido de cordón umbilical, tejido urológico, tejido vascular, tejido de venas y otros tejidos no calcificados.

De acuerdo con una modalidad, la fuente del tejido suave deseado es un donador mamífero. De acuerdo con una modalidad, la fuente del tejido suave deseado es un donador humano. De acuerdo con una modalidad, el donador humano es un donador vivo. De acuerdo con otra modalidad, el donador humano es un donador cadavérico. De acuerdo con

todavía otra modalidad, el donador de tejido es el receptor propuesto de la matriz acelular.

De acuerdo con una modalidad, la fuente del tejido suave deseado es una fuente congelada y el paso de aislamiento (a) incluye un paso de descongelamiento de la fuente.

De acuerdo con algunas modalidades, el paso de aislamiento (a) se realiza a una temperatura de aproximadamente 25°C. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de aislamiento (a) se realiza a una temperatura de aproximadamente 4°C a aproximadamente 10°C. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de aislamiento (a) se realiza a temperatura ambiente.

De acuerdo con algunas modalidades, el paso de aislamiento (a) comprende la reducción de la biocarga del tejido suave antes de que sea aislado. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de aislamiento (a) comprende el enjuague con un líquido antes de reducir los niveles de biocarga en la superficie del tejido. De acuerdo con algunas modalidades, el líquido comprende solución salina amortiguada con fosfato (PBS). De acuerdo con algunas modalidades, el líquido comprende ácido acético. De acuerdo con algunas modalidades, el líquido comprende ácido peracético.

2. Paso de procesamiento previo (b): procesamiento previo de la muestra de tejido suave

De acuerdo con algunas modalidades, el paso de procesamiento previo (b) incluye la reducción de tamaño de la muestra de tejido suave. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de procesamiento previo (b) comprende el corte de la muestra de tejido suave en tiras. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de procesamiento previo (b) comprende el rebanado de la muestra de tejido suave. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de procesamiento previo (b) comprende el corte de la muestra de tejido suave en trozos. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de procesamiento previo (b) comprende el desmenuzamiento de la muestra de tejido suave. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de procesamiento previo (b) comprende la trituración de la muestra de tejido suave. De acuerdo con algunas modalidades, la muestra de tejido suave se muele utilizando una placa gruesa. De acuerdo con algunas modalidades, la muestra de tejido suave se muele utilizando una placa fina. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de separación (b) comprende la molienda de la muestra de tejido suave deseado. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de procesamiento previo (b) comprende la homogeneización de la muestra de tejido suave. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de procesamiento previo

(b) comprende la separación de componentes de la muestra de tejido suave por medio del asentamiento diferencial de los componentes del tejido suave.

De acuerdo con algunas modalidades, el paso de procesamiento previo (b) se realiza a una temperatura de aproximadamente 25°C. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de procesamiento previo (b) se realiza a una temperatura de aproximadamente 4°C a aproximadamente 10°C. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de procesamiento previo (b) se realiza a temperatura ambiente. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de procesamiento previo (b) se realiza a una temperatura mayor que la temperatura ambiente. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de procesamiento previo (b) se realiza a una temperatura fisiológica de un mamífero vivo. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de procesamiento previo (b) se realiza a una temperatura de aproximadamente 37°C.

3. Paso de deslipidizacón (c): deslipidización de la muestra de tejido suave

De acuerdo con algunas modalidades, el paso de deslipidización (c) es un paso para retirar lípidos de la muestra de tejido suave. También puede ocurrir alguna alteración de membranas celulares y remoción de células. De

acuerdo con algunas modalidades, el paso de deslipidización (c) comprende la remoción de algunos de los lípidos nativos para el tejido suave. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de deslipidización (c) comprende la remoción de la mayoría de los lípidos nativos para el tejido suave. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de deslipidización (c) comprende la remoción de sustancialmente todos los lípidos nativos para el tejido suave. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de deslipidización (c) retira sustancialmente todos los lípidos nativos para el tejido suave. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de deslipidización (c) altera las membranas celulares de células residentes en el tejido suave. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de deslipidización (c) retira componentes celulares del tejido suave. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de deslipidización (c) se realiza después del paso de descelularización (d). De acuerdo con algunas modalidades, se realizan múltiples pasos de deslipidización. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de deslipidización (c) no se realiza.

De acuerdo con algunas modalidades, el paso de deslipidización (c) comprende poner en contacto el tejido suave con un líquido con el fin de separar lípidos del tejido suave. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de deslipidización (c) comprende la inmersión del tejido

suave en el líquido. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de deslipidización (c) comprende el remojo del tejido suave en el líquido. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de deslipidización (c) comprende la agitación mecánica del tejido suave en el líquido. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de deslipidización (c) comprende la combinación del tejido suave en el líquido. De acuerdo con algunas modalidades, la combinación incluye un paso que consiste en mezclar el tejido suave en el líquido bajo condiciones de alto esfuerzo cortante. De acuerdo con algunas modalidades, la combinación incluye un paso que consiste en mezclar el tejido suave en el líquido utilizando por lo menos una cuchilla giratoria que gira a una velocidad en el intervalo de aproximadamente 1,000 rpm a aproximadamente 20,000 rpm. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de deslipidización (c) comprende la homogeneización del tejido suave en el líquido. De acuerdo con algunas modalidades, la homogeneización incluye un paso que consiste en mezclar el tejido suave en el líquido de tal manera que el tejido se distribuya uniformemente por todo el líquido.

De acuerdo con algunas modalidades, el líquido es agua. De acuerdo con algunas modalidades, el líquido es un solvente orgánico. De acuerdo con algunas modalidades, el líquido es una mezcla de solventes orgánicos. De acuerdo

con algunas modalidades, el líquido es una mezcla de uno o más solventes orgánicos y agua. De acuerdo con algunas modalidades, el solvente orgánico se selecciona de un grupo que consiste en una parafina, hidrocarburo aromático, hidrocarburo cíclico, hidrocarburo clorado, hidrocarburo fluorado, metano clorado, metano fluorado, alcohol, éter, cetona, ácido orgánico, aldehído, éster y combinaciones de los mismos. De acuerdo con algunas modalidades, el solvente orgánico tiene un átomo de carbono. De acuerdo con algunas modalidades, el solvente orgánico tiene dos átomos de carbono. De acuerdo con algunas modalidades, el solvente orgánico tiene tres átomos de carbono. De acuerdo con algunas modalidades, el solvente orgánico tiene cuatro átomos de carbono. De acuerdo con algunas modalidades, el solvente orgánico tiene cinco átomos de carbono. De acuerdo con algunas modalidades, el solvente orgánico tiene seis átomos de carbono.

De acuerdo con algunas modalidades, el líquido incluye un ácido orgánico. De acuerdo con algunas modalidades, el líquido incluye un ácido mineral. De acuerdo con algunas modalidades, el líquido incluye una base orgánica. De acuerdo con algunas modalidades, el líquido incluye una base mineral. De acuerdo con algunas modalidades, el líquido incluye una sal orgánica. De acuerdo con algunas modalidades, el líquido contiene una

sal mineral.

De acuerdo con algunas modalidades, el paso de deslipidización (c) comprende la recuperación de una capa de lípidos, la cual puede ser una mezcla de lípido y el líquido mencionado anteriormente, del tejido suave. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de deslipidización (c) comprende la recuperación de la capa de lípidos por medio del asentamiento diferencial. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de deslipidización (c) comprende la recuperación de la capa de lípidos por medio de la centrifugación. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de deslipidización (c) comprende la recuperación de la capa de lípidos por medio de la filtración. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de deslipidización (c) comprende la recuperación de la capa de lípidos por medio de la decantación.

De acuerdo con algunas modalidades, el paso de deslipidización (c) comprende la recuperación del tejido deslipidizado. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de deslipidización (c) comprende la recuperación del tejido deslipidizado por medio del asentamiento diferencial. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de deslipidización (c) comprende la recuperación del tejido deslipidizado por medio de la centrifugación. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de deslipidización (c) comprende la

recuperación del tejido deslipidizado por medio de la filtración. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de deslipidización (c) comprende la recuperación del tejido deslipidizado por medio de la decantación.

De acuerdo con algunas modalidades, el paso de deslipidización (c) comprende el contacto del tejido suave con un fluido supercrítico (por ejemplo, dióxido de carbono supercrítico). De acuerdo con algunas modalidades, el paso de deslipidización (c) comprende la recuperación del lípido por medio de la evaporación del fluido supercrítico.

De acuerdo con algunas modalidades, el paso de deslipidización (c) se realiza a una temperatura de aproximadamente 25°C. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de deslipidización (c) se realiza a temperatura ambiente. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de deslipidización (c) se realiza a una temperatura mayor que la temperatura ambiente. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de deslipidización (c) se realiza a una temperatura fisiológica de un mamífero vivo. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de deslipidización (c) se realiza a una temperatura de aproximadamente 37°C.

4. Paso de descelularización (d): descelularización de la muestra de tejido suave

De acuerdo con algunas modalidades, el paso de

descelularización (d) comprende un paso que consiste en retirar células y fragmentos de células de una muestra de tejido suave. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de descelularización (d) convierte el tejido suave a una matriz acelular de ECM. De acuerdo con algunas modalidades, la matriz acelular está esencialmente libre de fragmentos de células. De acuerdo con algunas modalidades, la matriz acelular está completamente libre de fragmentos de células. De acuerdo con algunas modalidades, la matriz acelular está libre de factores tejidogénicos nativos. De acuerdo con algunas modalidades, la matriz acelular incluye factores tejidogénicos nativos.

De acuerdo con algunas modalidades, el paso de descelularización (d) comprende el contacto de la muestra de tejido suave con una solución de descelularización. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de descelularización (d) comprende el contacto del tejido suave con una solución de descelularización con el fin de alterar las células y retirar células y fragmentos de células del tejido. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de descelularización (d) comprende la inmersión del tejido suave en la solución de descelularización. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de descelularización (d) comprende el remojo del tejido suave en la solución de descelularización. De acuerdo con algunas

modalidades, el paso de descelularización (d) comprende la agitación mecánica del tejido suave en la solución de decelularización. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de descelularización (d) comprende la combinación del tejido suave en la solución de descelularización. De acuerdo con algunas modalidades, la combinación incluye un paso que consiste en mezclar el tejido suave en la solución de descelularización bajo condiciones de alto esfuerzo cortante. De acuerdo con algunas modalidades, la mezcla incluye un paso que consiste en mezclar el tejido suave con la solución de descelularización utilizando por lo menos una cuchilla giratoria que gira a una velocidad en el intervalo de aproximadamente 1,000 rpm a aproximadamente 20,000 rpm. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de descelularización (d) comprende la homogeneización del tejido suave en la solución de descelularización. De acuerdo con algunas modalidades, la homogeneización incluye un paso que consiste en mezclar el tejido suave en la solución de descelularización de tal manera que el tejido se distribuya uniformemente por todo el líquido. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de descelularización (d) comprende múltiples pasos de descelularización. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de descelularización (d) se realiza antes de un paso de deslipidización.

De acuerdo con algunas modalidades, la solución

de descelularización es hipertónica en relación con el interior de las células. De acuerdo con algunas modalidades, la solución de descelularización es hipotónica en relación con el interior de las células. De acuerdo con algunas modalidades, la solución de descelularización incluye una sal. De acuerdo con algunas modalidades, la solución de descelularización es una solución salina. De acuerdo con algunas modalidades, la sal es cloruro de sodio. De acuerdo con algunas modalidades, la solución de descelularización es una solución de pH amortiguado. De acuerdo con algunas modalidades, la solución de pH amortiguado tiene un pH fisiológico. De acuerdo con algunas modalidades, la solución de pH amortiguado tiene un pH de aproximadamente 7.4.

De acuerdo con algunas modalidades, la solución de descelularización incluye un detergente, emulsionante o surfactante. De acuerdo con algunas modalidades, el detergente, emulsionante o surfactante incluye un derivado de un ácido graso de cadena larga. De acuerdo con algunas modalidades, el detergente, emulsionante o surfactante incluye desoxicolato de sodio. De acuerdo con algunas modalidades, el detergente, emulsionante o surfactante incluye lauril-sulfato de sodio. De acuerdo con algunas modalidades, el detergente, emulsionante o surfactante incluye dodecil-sulfato de sodio. De acuerdo con algunas

modalidades, el detergente, emulsionante o surfactante incluye un surfactante no iónico. De acuerdo con algunas modalidades, el detergente, emulsionante o surfactante incluye un derivado de polioxietileno de un ácido graso de cadena larga. De acuerdo con algunas modalidades, el detergente, emulsionante o surfactante incluye un monolaurato de polioxietileno-sorbitán. De acuerdo con algunas modalidades, el detergente, emulsionante o surfactante incluye un derivado de polioxietileno de un hidrocarburo aromático.

De acuerdo con algunas modalidades, la concentración del detergente, emulsionante o surfactante está presente en un solvente en una concentración en el intervalo de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 5.0% (p/v). De acuerdo con algunas modalidades, el solvente incluye agua. De acuerdo con algunas modalidades, el solvente incluye un solvente orgánico. De acuerdo con algunas modalidades, el solvente incluye una mezcla de agua y un solvente orgánico. De acuerdo con algunas modalidades, el solvente incluye menos de 20% de solvente orgánico en volumen. De acuerdo con algunas modalidades, el solvente incluye de aproximadamente 20% a aproximadamente 40% de solvente orgánico en volumen. De acuerdo con algunas modalidades, el solvente incluye de aproximadamente 40% a aproximadamente 60% de solvente orgánico en volumen. De

acuerdo con algunas modalidades, el solvente incluye de aproximadamente 60% a aproximadamente 80% de solvente orgánico en volumen. De acuerdo con algunas modalidades, el solvente incluye más de 80% de solvente orgánico en volumen.

De acuerdo con algunas modalidades, el solvente orgánico se selecciona de un grupo que consiste en una parafina, hidrocarburo aromático, hidrocarburo cíclico, hidrocarburo clorado, hidrocarburo fluorado, metano clorado, metano fluorado, alcohol, éter, cetona, aldehído, éster, ácido orgánico y combinaciones de los mismos. De acuerdo con algunas modalidades, el solvente orgánico tiene un átomo de carbono. De acuerdo con algunas modalidades, el solvente orgánico tiene dos átomos de carbono. De acuerdo con algunas modalidades, el solvente orgánico tiene tres átomos de carbono. De acuerdo con algunas modalidades, el solvente orgánico tiene cuatro átomos de carbono. De acuerdo con algunas modalidades, el solvente orgánico tiene cinco átomos de carbono. De acuerdo con algunas modalidades, el solvente orgánico tiene seis átomos de carbono.

De acuerdo con algunas modalidades, la solución de descelularización incluye una enzima. De acuerdo con algunas modalidades, la solución de descelularización incluye una lipasa. De acuerdo con algunas modalidades, la

solución de descelularización incluye una colagenasa. De acuerdo con algunas modalidades, la solución de descelularización incluye tripsina. De acuerdo con algunas modalidades, la solución de descelularización incluye una endonucleasa. De acuerdo con algunas modalidades, la solución de descelularización incluye una proteasa. De acuerdo con algunas modalidades, la solución de descelularización incluye un inhibidor de proteasa.

De acuerdo con algunas modalidades, la solución de descelularización es levemente alcalina. De acuerdo con algunas modalidades, la solución de descelularización es levemente ácida. En algunas modalidades, la solución de descelularización tiene un pH que es menor que 6. De acuerdo con algunas modalidades, la solución de descelularización tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 6 a aproximadamente 8. En algunas modalidades, la solución de descelularización tiene un pH que es mayor que 10. De acuerdo con algunas modalidades, la solución de descelularización incluye ácido peracético.

De acuerdo con algunas modalidades, el tejido suave está en contacto con la solución de descelularización durante por lo menos 6 horas. De acuerdo con algunas modalidades, el tejido suave está en contacto con la solución de descelularización durante por lo menos 12 horas. De acuerdo con algunas modalidades, el tejido suave

está en contacto con la solución de descelularización durante por lo menos 18 horas. De acuerdo con algunas modalidades, el tejido suave está en contacto con la solución de descelularización durante por lo menos 24 horas. De acuerdo con algunas modalidades, el tejido suave está en contacto con la solución de descelularización durante por lo menos 36 horas. De acuerdo con algunas modalidades, el tejido suave está en contacto con la solución de descelularización durante por lo menos 48 horas.

De acuerdo con algunas modalidades, el paso de descelularización (d) comprende un paso que consiste en raspar una capa celular de una membrana basal del tejido suave.

De acuerdo con algunas modalidades, el paso de descelularización (d) se realiza a una temperatura de aproximadamente 25°C. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de descelularización (d) se realiza a temperatura ambiente. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de descelularización (d) se realiza a una temperatura mayor que la temperatura ambiente. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de descelularización (d) se realiza a una temperatura fisiológica de un mamífero vivo. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de descelularización (d) se realiza a una temperatura de aproximadamente 37°C.

5. Paso de desinfección (e): desinfección del tejido suave

De acuerdo con algunas modalidades, el paso de desinfección (e) comprende la alteración y/o remoción de microorganismos en el tejido suave. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de desinfección (e) comprende la alteración y/o remoción de virus en el tejido suave.

De acuerdo con algunas modalidades, el paso de desinfección (e) comprende el contacto del tejido suave con una solución desinfectante. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de desinfección (e) comprende la inmersión del tejido suave en la solución desinfectante. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de desinfección (e) comprende el remojo del tejido suave en la solución desinfectante. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de desinfección (e) comprende la agitación mecánica del tejido suave en la solución desinfectante. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de desinfección (e) comprende la combinación del tejido suave en la solución desinfectante. De acuerdo con algunas modalidades, la combinación incluye un paso que consiste en mezclar el tejido suave en la solución desinfectante bajo condiciones de alto esfuerzo cortante. De acuerdo con algunas modalidades, la combinación incluye un paso que consiste en mezclar el tejido suave en la solución desinfectante utilizando por lo menos una cuchilla giratoria que gira a

una velocidad en el intervalo de aproximadamente 1,000 rpm a aproximadamente 20,000 rpm.

De acuerdo con algunas modalidades, la solución desinfectante incluye un antibiótico. De acuerdo con algunas modalidades, la solución desinfectante incluye más de un antibiótico. De acuerdo con algunas modalidades, la solución desinfectante incluye un alcohol. De acuerdo con algunas modalidades, la solución desinfectante incluye un glicol. De acuerdo con algunas modalidades, la solución desinfectante incluye una mezcla de agua con un alcohol y/o un glicol.

De acuerdo con algunas modalidades, la solución desinfectante incluye un compuesto de peroxi. De acuerdo con algunas modalidades, la solución desinfectante incluye ácido peracético. De acuerdo con algunas modalidades, la solución desinfectante incluye dióxido de cloro. De acuerdo con algunas modalidades, la solución desinfectante incluye un detergente o surfactante. De acuerdo con algunas modalidades, la solución desinfectante incluye una sal de etilen-diamina (por ejemplo, ácido etilen-diamina-tetraacético (EDTA)). De acuerdo con algunas modalidades, la solución desinfectante incluye un desnaturalizante de proteínas.

De acuerdo con algunas modalidades, la solución desinfectante incluye una sal caotrópica (por ejemplo,

isotiocianato de guanidina).

De acuerdo con algunas modalidades, el tejido suave está en contacto con la solución desinfectante durante por lo menos 1 hora. De acuerdo con algunas modalidades, el tejido suave está en contacto con la solución desinfectante durante por lo menos 2 horas. De acuerdo con algunas modalidades, el tejido suave está en contacto con la solución desinfectante durante por lo menos 4 horas.

De acuerdo con algunas modalidades, el paso de desinfección (e) comprende la exposición del tejido suave a radiación ionizante.

De acuerdo con algunas modalidades, el paso de desinfección (e) se realiza a una temperatura de aproximadamente 25°C. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de desinfección (e) se realiza a temperatura ambiente. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de desinfección (e) se realiza a una temperatura mayor que la temperatura ambiente. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de desinfección (e) se realiza a una temperatura fisiológica de un mamífero vivo. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de desinfección (e) se realiza a una temperatura de aproximadamente 37°C.

De acuerdo con algunas modalidades, el paso de desinfección (e) se realiza a un pH en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 8, de tal manera que el

tejido suave forme un gel fluido. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de desinfección (e) se realiza a un pH en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 8 de tal manera que el tejido suave forme un gel fluido. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de desinfección (e) se realiza a un pH inferior al punto isoeléctrico del colágeno.

De acuerdo con algunas modalidades, el tejido suave desinfectado se lava con agua para retirar la solución desinfectante del tejido suave desinfectado. De acuerdo con algunas modalidades, el tejido suave desinfectado se lava con una solución amortiguadora para retirar la solución desinfectante del tejido suave desinfectado. De acuerdo con algunas modalidades, el tejido suave desinfectado se lava con un amortiguador fisiológico para retirar la solución desinfectante del tejido suave desinfectado y llevar el tejido desinfectado a un pH fisiológico. De acuerdo con algunas modalidades, el tejido suave desinfectado se lava con una solución que contiene un solvente polar volátil para retirar la solución desinfectante del tejido suave desinfectado.

6. Paso de procesamiento posterior (f): procesamiento posterior de tejido suave

De acuerdo con algunas modalidades, el paso de

procesamiento posterior (f) comprende la formación del tejido suave en una forma física final. De acuerdo con algunas modalidades, la forma física final del tejido suave es una lámina. De acuerdo con algunas modalidades, la forma física final del tejido suave es particulado. De acuerdo con algunas modalidades, la forma física final del tejido suave es una pasta, gel, suspensión espesa o suspensión. De acuerdo con algunas modalidades, la forma física final del tejido suave es un bloque preformado, seco. De acuerdo con algunas modalidades, la forma física final del tejido suave es porosa. De acuerdo con algunas modalidades, la forma física final del implante es fibrosa.

De acuerdo con algunas modalidades, el paso de procesamiento posterior (f) comprende el corte de tejido suave a una forma final. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de procesamiento posterior (f) comprende la perforación del tejido suave. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de procesamiento posterior (f) incluye el secado con aire del tejido suave. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de procesamiento posterior (f) incluye el secado del tejido suave mientras se calienta el tejido suave. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de procesamiento posterior (f) incluye la liofilización de tejido suave. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de procesamiento posterior (f) incluye la reducción del

tamaño del tejido suave. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de procesamiento posterior (f) incluye la molienda del tejido suave. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de procesamiento posterior (f) incluye la molienda en estado congelado del tejido suave (es decir, la molienda del tejido suave mientras que se encuentra en un estado congelado, por ejemplo, por medio de la molienda de impacto). De acuerdo con algunas modalidades, el paso de procesamiento posterior (f) incluye la fracturación en estado congelado del tejido suave. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de procesamiento posterior (f) incluye la compresión del tejido suave.

De acuerdo con algunas modalidades, el paso de procesamiento posterior (f) comprende la rehidratación del tejido suave seco. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de procesamiento posterior (f) comprende la combinación de tejido suave particulado con un portador. De acuerdo con algunas modalidades, el portador incluye por lo menos uno de una solución isotónica, solución de cloruro de sodio, solución de Ringer con lactato, solución salina amortiguada con fosfato (PBS), plasma rico en plaquetas (PRP), ácido hialurónico (HA) o un derivado del mismo y hialuronato de sodio. De acuerdo con algunas modalidades, el portador es una solución de cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 1%.

De acuerdo con algunas modalidades, la solución de cloruro de sodio está a una concentración de aproximadamente 0.9%. De acuerdo con algunas modalidades, el portador comprende trombina. De acuerdo con algunas modalidades, el portador comprende fibrina. De acuerdo con algunas modalidades, el portador comprende glicerina. De acuerdo con algunas modalidades, el portador comprende colágeno. De acuerdo con algunas modalidades, el portador comprende lecitina. De acuerdo con algunas modalidades, el portador comprende un azúcar. De acuerdo con algunas modalidades, el portador comprende un polisacárido. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de procesamiento posterior (f) comprende la mezcla del tejido suave particulado con un portador en un sitio para la administración inmediata a un paciente.

De acuerdo con algunas modalidades, el tejido suave particulado se mezcla con un portador de tal manera que el tejido suave particulado y el portador se combinen para formar un gel fluido. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de mezcla se realiza a un pH en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 8. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de mezcla se realiza a un pH en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 8. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de mezcla se realiza a un pH inferior al punto

isoeléctrico del colágeno.

De acuerdo con algunas modalidades, el tejido suave particulado se mezcla con un portador de tal manera que el tejido suave particulado y el portador formen una pasta. De acuerdo con algunas modalidades, el portador incluye un polímero de tal manera que el tejido suave particulado y el polímero formen una pasta. De acuerdo con algunas modalidades, el polímero se selecciona del grupo que consiste de polisacáridos, ácidos nucleicos, carbohidratos, proteínas, polipéptidos, ácidos poli(α-hidroxi), poli(lactonas), poli(aminoácidos), poli(anhídridos), poli(ortoésteres), poli(anhídrido-co-imidas), poli(ortocarbonatos), poli(α-hidroxi-alcanoatos), poli(dioxanonas), poli(fosfoésteres), poli(L-lactida) (PLLA), poli(D,L-lactida) (PDLLA), poliglicólido (PGA), poli(lactida-co-glicólido (PLGA), poli(L-lactida-co-D,L-lactida), poli(D,L-lactida-co-trimetilen-carbonato), polihidroxibutirato (PHB), poli(ε-caprolactona), poli(δ-valerolactona), poli(γ-butirolactona), poli(caprolactona), ácido poliacrílico, ácido policarboxílico, clorhidrato de poli(alilamina), cloruro de poli(dialildimetilamonio), poli(etilenimina), fumarato de polipropileno, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, polietileno, polimetilmetacrilato, fibras de carbono, poli(etilenglicol), óxido de poli(etileno), alcohol

poli(vinílico), poli(vinilpirrolidona), poli(etiloxazolina), copolímeros de bloque de óxido de poli(etileno)-co-óxido de poli(propileno), poli(etilentereftalato)poliamida y copolímeros de los mismos.

De acuerdo con algunas modalidades, el paso de procesamiento posterior (f) comprende la caracterización de la matriz acelular. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de procesamiento posterior (f) comprende la caracterización de la matriz acelular para el contenido de ADN, en donde la ausencia de cantidades detectables de ADN indica la ausencia de células intactas y componentes celulares del tejido suave. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de procesamiento posterior (f) comprende la caracterización de la matriz acelular por la presencia de factores de crecimiento. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de procesamiento posterior (f) comprende la determinación de la distribución de tamaño de partícula de la matriz acelular particulada. De acuerdo con algunas modalidades, la mayoría de las partículas tienen áreas superficiales de 625 micrómetros cuadrados o menos. De acuerdo con algunas modalidades, por lo menos 80% de las partículas tienen áreas superficiales de 625 micrómetros cuadrados o menos.

7. Paso de empaque (g): empaque del tejido suave

De acuerdo con algunas modalidades, el paso de empaque (g) comprende la preparación del tejido suave para el almacenamiento y el uso subsecuente. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de empaque (g) comprende la inmersión del tejido suave en una solución conservadora. De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, la solución conservadora es etanol acuoso. De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, el paso de empaque (g) comprende el congelamiento del tejido suave para el almacenamiento. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de empaque (g) comprende el empaque del tejido suave en un estado seco o liofilizado. De acuerdo con algunas modalidades, el tejido suave se encuentra en una forma particulada seca o liofilizada, y el paso de empaque (g) comprende el empaque del tejido seco o liofilizado en un recipiente estéril. De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, el paso de empaque (g) comprende el congelamiento del tejido seco o liofilizado para el almacenamiento. De acuerdo con algunas modalidades, el paso de empaque (g) comprende el almacenamiento del tejido seco o liofilizado a temperaturas entre 4°C y la temperatura ambiente.

De acuerdo con algunas modalidades, el tejido suave se empaca mientras que se encuentra en un estado congelado. De acuerdo con algunas modalidades, el tejido

suave se proporciona en un estado congelado y luego se descongela antes del empaque. De acuerdo con algunas modalidades, el tejido suave no se encuentra en un estado congelado cuando se proporciona y se empaca mientras que se encuentra en el estado en el cual se proporciona.

8. Adición de células tejidogénicas

De acuerdo con algunas modalidades, el método para fabricar un implante comprende además la adición de células tejidogénicas al tejido suave descelularizado. Los implantes con células tejidogénicas agregadas se plantean en otra parte anteriormente. Estas células tejidogénicas o implantes con células tejidogénicas agregadas pueden ser crioconservados.

La crioconservación se utiliza para la conservación a largo plazo de varios tejidos y células. De acuerdo con algunas modalidades, las células tejidogénicas derivadas de un tejido se pueden crioconservar, reconstituir y sembrar en una matriz aislada. De acuerdo con algunas modalidades, las células tejidogénicas derivadas de un tejido se pueden crioconservar, reconstituir y sembrar en una matriz aislada para promover la tejidogénesis in vitro e in vivo.

Los efectos perjudiciales de la formación de cristales de hielo y la concentración incrementada de

soluto en células crioconservadas se pueden reducir por medio del uso de aditivos o productos químicos crioprotectores que protegen las células durante el congelamiento. Los agentes crioprotectores utilizados comúnmente incluyen, pero no están limitados a, sulfóxido de dimetilo (DMSO), etilenglicol, propilenglicol, 2-metil-2,4-pentanodiol (MPD), sacarosa y glicerol. Los ejemplos de soluciones de crioconservación que se pueden utilizar en la conservación de un tejido o una matriz incluyen, pero no están limitados a, una solución de medios basales comercialmente disponible tal como, Mesencult (Stem Cell Technologies) o Hyclone AdvanceStem, Suero Bovino Fetal con 5-15% de DMSO, albúmina de suero bovino con 5-15% de DMSO, albúmina de suero humano con 5-15% de DMSO, Aedesta (Cell Preservation Solutions), LiforCell (Lifeblood Medical), etilenglicol, propilenglicol y glicerol.

De acuerdo con algunas modalidades, el implante empacado se puede conservar durante un período de tiempo prolongado por medio del enfriamiento lento del implante empacado en presencia de un agente crioprotector y por medio del almacenamiento a temperaturas ultra-bajas. De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, el paso de empaque (g) comprende el congelamiento del implante de tejido suave a por lo menos una temperatura de -80°C. De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, el paso de

empaque (g) comprende el congelamiento del implante de tejido suave a una velocidad de congelamiento controlada. De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, la velocidad de congelamiento controlada es una velocidad de congelamiento controlada de aproximadamente 0.5°C por minuto a aproximadamente 10°C por minuto. De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, la velocidad de congelamiento controlada es una velocidad de congelamiento controlada de aproximadamente 1°C por minuto hasta aproximadamente -100°C.

9. Adición de componentes inductivos del crecimiento

De acuerdo con algunas modalidades, el método para fabricar un implante comprende además la complementación del tejido suave descelularizado con por lo menos un componente inductivo del crecimiento. De acuerdo con algunas modalidades de ese tipo, por lo menos el componente inductivo del crecimiento incluye uno o más de un hueso cortical desmineralizado, factor de crecimiento fibroblastos-2 (FGF-2), factor de crecimiento de fibroblastos-5 (FGF-5), factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), factor de crecimiento transformante beta (TGF-β), proteína morfogénica ósea-2 (BMP-2), proteína morfogénica ósea-7 (BMP-7), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento endotelial

vascular (VEGF), factor de crecimiento epidérmico neural-similar 1 (NELL-1) y una citocina.

De acuerdo con una modalidad, por lo menos el componente inductivo del crecimiento se deriva de tejido. De acuerdo con una modalidad, por lo menos el componente inductivo del crecimiento comprende células madre pluripotentes inducibles (iPSCs). De acuerdo con una modalidad, por lo menos el componente inductivo de crecimiento se origina a partir de un componente del componente inductivo del crecimiento derivado del tejido diferente de células. De acuerdo con una modalidad, las células tejidogénicas agregadas al tejido suave descelularizado secretan por lo menos el componente inductivo del crecimiento. De acuerdo con una modalidad, el componente inductivo del crecimiento comprende un medio de crecimiento derivado de células tejidogénicas explantadas.

De acuerdo con algunas modalidades, el tejido se enjuaga con un líquido antes de ser separado en piezas para reducir los niveles de biocarga sobre la superficie del tejido. De acuerdo con algunas modalidades, el líquido comprende solución salina amortiguada con fosfato (PBS). De acuerdo con algunas modalidades, el líquido comprende ácido acético. De acuerdo con algunas modalidades, el líquido comprende ácido peracético.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proponen con el fin de proveer a aquellas personas de experiencia ordinaria en el campo con una revelación y una descripción completas de modalidades ejemplares de la invención descrita, y no tienen por objeto limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención ni tienen por objeto representar que los experimentos posteriores son la totalidad de o los únicos experimentos realizados. Se han hecho esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etcétera) pero se deben suponer algunos errores experimentales y desviaciones. A menos que se indique de otra manera, las partes son partes en peso, el peso molecular es peso molecular promedio en peso, la temperatura está en grados centígrados (°C) y la presión está en o cerca de la presión atmosférica. Aunque las modalidades ejemplares se adaptan a tejidos suaves específicos, aquellas personas expertas en el campo reconocerán que los métodos descritos en este documento se pueden adaptar fácilmente a otros tejidos suaves. El tejido adiposo, dermis, facia, músculo, pericardio y otros tejidos conectivos o membranosos están entre los tejidos suaves que pueden ser procesados de acuerdo con los procesos de los métodos ejemplares, o variaciones de los mismos.

I. TEJIDO FUENTE: TEJIDO ADIPOSO

Las matrices acelulares derivadas de tejido adiposo pueden estar en forma a granel, forma particulada u otras formas. Estas matrices acelulares se pueden utilizar como agentes de carga para propósitos cosméticos o reconstructivos. Algunas aplicaciones específicas incluyen el uso como un agente de carga para restaurar contornos naturales donde el tejido adiposo nativo ha sido retirado o dañado por una lesión o desgaste o para corregir asimetrías de origen natural. En estos casos, las matrices acelulares también se pueden utilizar para estimular la regeneración de tejido adiposo y la integración natural de los tejidos regenerados. Las matrices acelulares también se pueden utilizar para suministrar células precursoras y/o factores tejidogénicos para la reparación o regeneración de tejido adiposo u otros tipos de tejido. Se pretende que el sumario anterior de usos sea representativo y no limite la variedad de usos para matrices derivadas de tejido adiposo acelulares de acuerdo con modalidades de la presente invención.

EJEMPLO 1: Descelularización con Desoxicolato de Sodio

El tejido adiposo se recupera asépticamente de un donador cadavérico. Cualquier músculo, facia u otro tejido unido al tejido adiposo, si está presente, se aparta. Porciones iguales del tejido adiposo se miden en matraces

vacíos y se lavan por medio de la agitación en agua desionizada, en una relación de aproximadamente 1000 ml de agua con respecto a 500 mg de tejido. Después de un período de tiempo suficiente para retirar sangre y tejido suelto del tejido adiposo, el agua se drena del matraz, mientras que se recolecta el tejido adiposo en un tamiz de 212 μm a 300 μm. Después de que el agua se drena, el tejido adiposo se regresa al matraz.

Después del paso de lavado, el tejido adiposo se remoja con agitación mecánica en una solución al 4% de desoxicolato de sodio, en una relación de aproximadamente 1000 mL de solución de desoxicolato con respecto a 500 mg de tejido adiposo. Después de un período de tiempo suficiente para alterar y retirar los adipocitos y otras células del tejido adiposo, la solución de desoxicolato se drena del matraz, mientras que se recolecta el tejido adiposo en un tamiz de 212 μm a 300 μm. Después de que la solución de desoxicolato se drena, el tejido adiposo se regresa al matraz y se enjuaga repetidamente en agua desionizada para retirar cualquier desoxicolato residual del tejido. Después de cada enjuague, el agua se drena del matraz, como se describiera anteriormente, y el tejido adiposo recolectado se regresa al matraz.

Después del último enjuague con agua, el tejido adiposo se remoja en una solución esterilizante con

agitación mecánica. Una solución esterilizante adecuada sería de 0.5% a 1.0% de ácido peracético en agua desionizada. Uno o más remojos adicionales en solución esterilizante pueden ser necesarios para esterilizar adecuadamente el tejido adiposo. Después del remojo esterilizante final, el tejido adiposo se enjuaga repetidamente en agua desionizada para retirar cualquier rastro de solución esterilizante del tejido.

Después del enjuague final con agua, el tejido adiposo se almacena bajo refrigeración o se congela, o se sujeta a pasos de procesamiento adicionales, tal como la deslipidización.

EJEMPLO 2: Descelularización con una Solución Hipertónica

Una muestra de tejido adiposo se mide en un matraz y una solución hipertónica (por ejemplo, NaCl 1 M) se agrega en una relación 2:1. La mezcla se agita durante por lo menos 12 horas a temperatura ambiente. Después de la agitación, la solución hipertónica se decanta y el tejido adiposo se captura en un tamiz de 212 μm a 300 μm. El tejido adiposo recuperado se regresa al matraz y se remoja en una solución de surfactante al 0.1% con agitación durante por lo menos 12 horas a temperatura ambiente.

Después del último enjuague con agua, el tejido adiposo se remoja en una solución esterilizante, con

agitación. Una solución esterilizante adecuada sería de 0.5% a 1.0% de ácido peracético en una mezcla de agua, etanol y propilenglicol. Uno o más remojos adicionales en solución esterilizante pueden ser necesarios para esterilizar adecuadamente el tejido adiposo. Después del remojo esterilizante final, el tejido adiposo se enjuaga repetidamente en agua desionizada para retirar cualquier rastro de solución esterilizante del tejido.

Después del enjuague final con agua, el tejido adiposo se almacena bajo refrigeración o se congela, o se sujeta a pasos de procesamiento adicionales, tal como la deslipidización.

EJEMPLO 3: Remoción de Lípidos de un Tejido Adiposo

Una muestra de tejido adiposo, la cual puede estar descelularizada o puede no estar tratada, se recolecta y se realiza una reducción de tamaño, tal como la molienda o desmenuzamiento. A la temperatura ambiente o mayor, el tejido adiposo se coloca en un tubo cónico o matraz, y se homogeniza. El tejido homogenizado luego se centrifuga para separar capas de lípidos y agua del tejido, teniendo cuidado de no perder la capa de tejido flotante.

EJEMPLO 4: Deslipidización de un Tejido Adiposo

Una muestra de tejido adiposo, la cual puede

estar descelularizada o puede no estar tratada, se recolecta y se realiza una reducción de tamaño, tal como molienda o desmenuzamiento. Después de la reducción de tamaño, el tejido adiposo se puede procesar como se describe en el Ejemplo 2, luego se deslipidiza de la siguiente manera.

El tejido adiposo se divide igualmente entre una variedad de tubos cónicos y se agrega un solvente orgánico (por ejemplo, un alcohol) al tubo. Los surfactantes (por ejemplo, Triton X-100 o Tween 80) también se pueden agregar para promover la remoción de lípidos. La mezcla de alcohol/tejido se homogeniza rápidamente a la temperatura ambiente o mayor, y la mezcla homogenizada se centrifuga para separar capas de lípidos, solvente, agua y tejido. Las capas de lípidos y solvente se retiran del tubo y el tejido se recupera. El paso de homogenización con solvente se repite durante una variedad de veces suficientes para retirar la totalidad de lípido del tejido.

Después del tratamiento final con solvente, el tejido se homogeniza con agua y el agua se separa del tejido por medio de la centrifugación. Estos pasos se pueden repetir una variedad de veces para retirar los rastros finales de alcohol. El homogenado se puede incubar antes de ser centrifugado. Un lavado final con PBS se puede realizar. La remoción de los lípidos del tejido se puede

verificar por cualquiera de una variedad de ensayos de lípidos bien conocidos.

EJEMPLO 5: Fabricación de un Implante Acelular

Una muestra de tejido suave rico en tejido adiposo se obtiene de un donador adecuado. El tejido se inspecciona por músculo y dermis, el cual luego se separa del tejido adiposo. La reducción de tamaño entonces se realiza por medio de la molienda o desmenuzamiento del tejido adiposo, o por medio de otro método adecuado.

El tejido adiposo luego se deslipidiza por medio del método del Ejemplo 3, o por medio del método descrito en este documento. El tejido adiposo se divide entre una variedad de tubos de centrífuga y una pequeña cantidad de agua se agrega a cada tubo para humedecer el tejido. El tejido se calienta a una temperatura superior a la temperatura ambiente y se centrifuga para separar una capa de lípidos del tejido. Se forma una capa de lípidos, una capa de agua, una capa de tejido adiposo y un aglomerado de fondo.

La capa de tejido adiposo se recupera y se combina con una porción igual de un alcohol, o alcohol con surfactantes o detergentes (por ejemplo, Triton X-100 o Tween 80) luego se regresa al tubo de centrífuga. La mezcla de tejido adiposo y alcohol se centrifuga para separar la

mezcla en capas de lípido, alcohol y tejido adiposo. El tejido adiposo luego se recupera y el tratamiento con alcohol se repite una variedad de veces para retirar la totalidad del lípido del tejido.

Después del tratamiento final con alcohol, el tejido adiposo se remoja en una solución hipertónica (por ejemplo, NaCl 1 M) con agitación durante por lo menos 6 horas a temperatura ambiente. El tejido y la solución hipertónica se pueden combinar antes de que el paso de remojo comience. Después del remojo en una solución hipertónica, el tejido adiposo se recupera de la mezcla por medio de la centrifugación a una temperatura superior a la temperatura ambiente y se remoja en una solución diluida de detergente o surfactante con agitación durante por lo menos 12 horas a temperatura ambiente. Una solución adecuada tendría por lo menos 0.1% de un surfactante en agua. Después del remojo en el detergente, el tejido adiposo se recupera por medio de la centrifugación y se enjuaga por lo menos dos veces en agua desionizada.

Después del enjuague con agua, el tejido adiposo recuperado se suspende en una solución desinfectante y se deja remojar con agitación. Una solución desinfectante adecuada sería entre 0.5% y 1% de ácido peracético en una mezcla de agua, etanol y propilenglicol. El tejido adiposo luego se recupera por medio de la centrifugación y se

sujeta a múltiples enjuagues con agua para retirar cualquier solución desinfectante remanente.

El tejido adiposo enjuagado entonces se seca y se muele a una forma particulada. El secado se puede realizar por medio de la liofilización. El tejido adiposo seco se puede moler adicionalmente en un estado congelado (molienda por impacto o molienda en estado congelado) para reducir adicionalmente los tamaños de partícula del tejido y para producir un tejido particulado fluido. Los protocolos de molienda adecuados son conocidos en el campo.

El tejido particulado puede ser empacado en un recipiente estéril para el uso posterior o se puede descongelar y rehidratar inmediatamente. En un método de rehidratación, una cantidad descrita del tejido particulado descongelado se agrega a una primera jeringa. La cantidad deseada de fluido (por ejemplo, un portador) se agrega a una segunda jeringa y las jeringas se unen entre sí utilizando una tapa de acoplamiento de hembra a hembra. El fluido se expulsa lentamente dentro de la jeringa rellena de tejido, mientras que se oprimen los émbolos en ambas jeringas. La totalidad de la mezcla de tejido y fluido se transfiere a una de las jeringas y la otra se desecha. A la jeringa que contiene la mezcla se le coloca un tapón y se empaca en una hoja delgada de metal y/o una bolsa Kapak^{MR} (Kapak Corporation, St. Louis Park, MN).

EJEMPLO 6: Fabricación de un Implante al Sembrar de Nuevo Células Madre Derivadas de Tejido Adiposo en una Matriz Descelularizada

El tejido adiposo con su nicho de células madre endógeno se recupera asépticamente de un donador cadavérico dentro de 24 pos-mortem o de donadores vivos que se someten a una cirugía de liposucción electiva. Por ejemplo, la grasa visceral puede ser extirpada de donadores cadavéricos u obtenida con el consentimiento de donadores vivos que se someten a procedimientos electivos, tal como la liposucción, de regiones del cuerpo ricas en tejido adiposo, por ejemplo, caderas, muslos y abdomen. El tejido adiposo subcutáneo se puede producir a partir de la hipodermis al diseccionarlo del espesor completo de piel extirpada de un donador cadavérico. El tejido adiposo de almohadillas adiposas infrarrotulianas se puede diseccionar durante la recuperación de la rodilla en bloque de un donador cadavérico. El tejido adiposo se almacena a 4°C hasta que esté listo para el procesamiento. Generalmente, el procesamiento de tejido comienza dentro de 72 horas pos-mortem. El tejido adiposo se expone a un reductor de biocarga para generar tejido adiposo procesado previamente. El tejido adiposo procesado previamente se sujeta a una serie de remojos con PBS con agitación. El tejido adiposo agitado procesado previamente entonces se pica en piezas pequeñas de aproximadamente 0.5 x 0.5 x 0.5 cm. Las

piezas picadas de tejido adiposo entonces se sujetan a una serie de enjuagues con PBS frío. El pH del producto enjuagado está a o cerca del pH fisiológico al final del enjuague. El producto enjuagado se divide en dos lotes para el aislamiento de células madre y la preparación de matriz descelularizada.

Aislamiento de ASCs

Las células madre derivadas de tejido adiposo viables (ASCs) se aíslan de acuerdo con protocolos establecidos (Young y colaboradores, 2011, Acta Biomaterialia, 7: 1040-1049). En resumen, después de enjuagues con una solución salina amortiguada (por ejemplo, PBS 0.01 M, pH 7.4), un lote del tejido enjuagado se digiere con un agente de disociación (por ejemplo, colagenasa) con el propósito de dispersar el tejido mientras se mantiene la viabilidad celular. El producto digerido se sujeta a la centrifugación para separar la fracción vascular estromal (SVF) rica en células madre derivadas de tejido adiposo del sobrenadante rico en adipocitos rellenos de lípidos y matriz. El sobrenadante se aspira y el producto aspirado se congela a -80°C hasta el uso adicional. El aglomerado de SVF se resuspende en solución de lavado de PBS y se sujeta a una serie de lavados con PBS frío con pasos alternantes de centrifugación. Después del lavado final y la resuspensión

en PBS, la solución resuspendida se sujeta a la filtración para retirar el tejido no digerido y para obtener la SVF aislada enriquecida con ASCs para la siembra. Alternativamente, las ASCs se pueden aislar de las otras células presentes en el tejido adiposo digerido con base en el tamaño de las células o inmunohistoquímicamente, por ejemplo, por medio del uso de perlas magnéticas, cromatografía de afinidad, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), citometría de flujo o con un dispositivo adecuado.

Adicionalmente, las ASCs aisladas expresan antígenos que incluyen, pero no están limitados a, CD73, CD90, CD29, CD44, CD105 y/o una combinación de los mismos. Adicional o alternativamente, las ASCs aisladas no expresan antígenos que incluyen, pero no están limitados a, CD33, CD34, CD45, CD4, CD31, CD62p CD14, HLA-DR y/o una combinación de los mismos.

Adicionalmente, una muestra se segrega con el propósito de evaluar la actividad biológica del tejido utilizando métodos comercialmente disponibles que incluyen, pero no están limitados a, por ejemplo, ensayos metabólicos tales como que involucran luciferasa, sales de tetrazolio, por ejemplo, bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio

(MTS), 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida (XTT) y otras sales de tetrazolio solubles en agua (por ejemplo, WST-1, -3, -4, -5, -8, -9, -10 y -11) y ensayos de exclusión de tinte tal como Azul de Triptano.

Alternativamente, las ASCs aisladas se pueden cultivar sin diferenciación utilizando medios de cultivo estándar complementados típicamente con 5%-20% de suero. Por ejemplo, las ASCs se pasan por lo menos 5 veces en este medio sin diferenciación, mientras que aún retienen su multiplicidad. Las células madre derivadas de tejido adiposo se pueden mantener en medio de control hasta 80% de confluencia. Las células se recolectan en la confluencia y la duplicación de la población se calcula utilizando la fórmula $\log N_1/\log N_2$, donde N_1 es el número de células en confluencia antes de la pasada y N_2 es el número de células sembradas después de la pasada. La duplicación de la población acumulativa se determina en cultivos mantenidos hasta la pasada 13 (aproximadamente 165 días). La duplicación de la población acumulativa promedio obtenida de 3 donadores se expresa como una función del número de pasadas.

Confirmación de la Diferenciación Multi-linaje de Células Madre Derivadas de Tejido Adiposo

Las células madre derivadas de tejido adiposo en

la pasada 1 se pueden analizar por su capacidad para diferenciarse hacia los linajes adipogénicos, osteogénicos, condrogénicos y miogénicos. Para inducir la diferenciación, las células madre se cultivan con medios de inducción específicos como se detalla en la Tabla 12.

Tabla 12. Diferenciación específica del linaje inducida por complementación de medios

Medio	Medios	Suero	Suplementación
Control	DMEM	10% de FBS	ninguna
Adipogénico (AM)	DMEM	10% de FBS	isobutil-metilxantina 0.5 mM (IBMX), dexametasona 1 μM, insulina 10 uM, indometacina 200 μM, 1% de antibiótico/antimicótico
Osteogénico (OM)	DMEM	10% de FBS	dexametasona 0.1 μM, ascorbato-2- fosfato 50 μM, (β-glicerofosfato 10 mM, 1% de antibiótico/antimicótico
Condrogénico (CM)	DMEM	1% de FBS	6.25 μg/ml de insulina, 10 ng/ml de TGFβ1, ascorbato-2-fosfato 50 nM, 1% de antibiótico/antimicótico
Miogénico (MM)	DMEM	10% de FBS, 5% de HS	dexametasona 0.1 μM, hidrocortisona 50 μM, 1% de antibiótico/antimicótico

Se ha descrito y mostrado previamente que cada medio induce la diferenciación multi-linaje de MSCs (Pittenger, M. y colaboradores, 1999, Science 284: 143-147; Grigoradis, A. y colaboradores, 1988, J. Cell. Biol., 106: 2139-2151; Cheng, S-L. y colaboradores, 1994, Endo, 134: 277-286; Loffler, G. y colaboradores, 1987, Klin. Wochenschr, 65: 812-817; Hauner, H. y colaboradores, 1987, J. Clin. Endocrinol. Metabol. 64: 832-835). La diferenciación se confirma utilizando los ensayos histológicos e inmunohistológicos resumidos en la Tabla 13 y se compara con una fuente comercial de MSCs derivadas de médula ósea, precursores específicos del linaje (controles positivos) y fibroblastos de prepucio de humano (HFFs) (controles negativos)). Las células madre derivadas de tejido adiposo se mantienen en Medio de Control.

Tabla 13. Marcadores de Diferenciación y Ensayos de Diferenciación Específica del Linaje

Linaje	Determinante específico del linaje	Ensayo Histológico/Inmunohistoquímico
Adipogénico	1. Acumulación de Lípidos	1. Colorante Rojo Aceite O
Osteogénico	1. Actividad de fosfatasa alcalina	1. Colorante de fosfatasa alcalina
	2. Producción de matriz calcificada	2. Colorante Von Kossa
Condrogénico	1. Matriz rica en proteoglicano	1. Colorante Azul Alcián (pH 1.0)

	sulfatado	2. Colorante de safranina O
	2. Síntesis de colágeno II	3. Anticuerpo monoclonal específico para colágeno ll
Miogénico	1. Multi-nucleación	1. Microscopía de contraste de fase
	2. Expresión de cadena pesada de miocina de músculo esquelético y MyoD1	2. Anticuerpos monoclonales específicos para miocina y MyoD1

Adipogénesis

La diferenciación adipogénica se puede inducir por medio del cultivo de las células madre durante 2 semanas en Medio Adipogénico (AM) y se puede evaluar utilizando un colorante Rojo Aceite O como indicador de la acumulación intracelular de lípidos (Preece, A. 1972 A Manual for Histologic Technicians, Boston, Mass.: Little, Brown, and Co.). Antes de la coloración, las células se fijan durante 60 minutos a temperatura ambiente en formaldehído al 4%/calcio al 1% y se lavan con etanol al 70%. Las células se incuban en reactivo Rojo Aceite O al 2% (p/v) durante 5 minutos a temperatura ambiente. El colorante en exceso se retira por medio del lavado con etanol al 70%, seguido por varios cambios de agua destilada. Las células se contra-colorea durante 2 minutos con hematoxilina.

Preparación de Matriz Adiposa Descelularizada

La matriz adiposa descelularizada se obtiene ya sea por medio del uso del producto enjuagado original o el producto aspirado descongelado y filtrado que se obtiene durante el procedimiento de aislamiento de ASC. Después de una serie de lavados completos con PBS frío, el tejido descongelado se remoja en amortiguador de lisis con agitación mecánica continua. El tejido remojado luego se sujeta a la lisis de células para producir un tejido descelularizado. El tejido descelularizado estéril se puede sujetar a procedimientos alternativos. Por ejemplo, (1) se puede liofilizar y moler utilizando un molino congelador para producir un polvo de matriz derivado de tejido adiposo descelularizado; (2) se puede homogenizar para obtener una pasta o suspensión espesa de la matriz derivada de tejido adiposo descelularizado; (3) se puede homogenizar y liofilizar para obtener una matriz derivada de tejido adiposo tridimensional; o (4) se puede liofilizar para obtener una lámina de matriz de tejido descelularizado adiposo. Se puede deslipidizar y descelularizar de acuerdo con cualquiera de los métodos de los Ejemplos 1 hasta 5.

Recelularización

Las matrices descelularizadas derivadas de tejido adiposo en polvo, pasta/suspensión espesa, forma

tridimensional o de lámina se pueden utilizar para sembrar de nuevo ASCs aisladas. Después del paso de filtración para aislar las ASCs, la fracción estromal-vascular aislada (SVF) enriquecida con ASCs o ASCs purificados de otra manera se resuspende en medio basal o enriquecido con nutrientes. Una porción de la fracción SVF resuspendida o ASCs purificadas de otra manera entonces se agrega a una muestra de una matriz descelularizada derivada de tejido adiposo que se produce en cualquier forma (polvo, pasta/suspensión espesa, tridimensional o lámina). La matriz adiposa descelularizada que contiene las ASCs se incuba a 37°C. El paso de incubación es seguido por condiciones de siembra estáticas o dinámicas durante 24 horas, las cuales son bien conocidas en el campo. La matriz adiposa recelularizada entonces se sujeta a una serie de enjuagues con PBS frío para deslavar las células no adherentes indeseadas.

Crioconservación y Descongelamiento

Adicionalmente, antes de la crioconservación, uno o más componentes inductivos del crecimiento se pueden agregar opcionalmente. Estos incluyen, pero no están limitados a, proteínas morfogénicas óseas (BMPs), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de

crecimiento transformante beta (TGFβ), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico neural-similar 1 (NELL-1) y una combinación de los mismos. Para la crioconservación, por ejemplo, los medios basales Mesencult^{MR} se preparan y se filtran en condiciones estériles. Una solución crioprotectora en medio basal o rico en nutrientes se agrega con el propósito de asegurar la cobertura completa del tejido. El crioprotector ejemplar incluye, pero no está limitado a, sulfóxido de dimetilo (DMSO), glicerol, etilenglicol, propilenglicol, 2-Metil-2,4-pentanodiol (MPD) y sacarosa. Las muestras se empacan en recipientes criorresistentes. Una muestra como una muestra de sondeo se crioconserva en una unidad de crioconservación de laboratorio. El tejido empacado entonces se sujeta a una velocidad controlada lenta de congelamiento hasta por lo menos -80°C. Una vez que se completa el ciclo del programa, el tejido se coloca en nitrógeno líquido.

Antes del implante, un implante adiposo crioconservado se descongela. El procedimiento de descongelamiento calienta el tejido preparándolo para el implante. El frasquito que contiene solución de crioconservación y tejido se descongela a temperatura ambiente o se calienta alternativamente a 37°C para acelerar el proceso de descongelamiento. Alternativamente,

la temperatura de descongelamiento puede ser a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 4°C hasta 50°C. Alternativamente, el proceso de congelamiento-descongelamiento se puede repetir. Una vez que la solución de crioconservación está fluyendo libremente, la solución de crioconservación se decanta del frasquito y el tejido se implanta inmediatamente, sin ningún enjuague. Antes del implante, el tejido se enjuaga opcionalmente durante 0-15 minutos con las otras soluciones de lavado que incluyen pero no están limitadas a solución salina, dextrosa al 5% en solución de Ringer con lactato, solución salina amortiguada con fosfato y cualquier solución isotónica adicional.

La solución de lavado se agrega a temperatura ambiente o alternativamente, antes de la aplicación al tejido, la solución de lavado se calienta a una temperatura que no excede 37°C-39°C con el propósito de minimizar cualquier daño a las células contenidas en el tejido. La solución de lavado se intercambia por todo el enjuague o alternativamente el tejido se almacena en la solución de lavado a 4°C hasta que está listo para el implante. Cualquier tejido restante de la cirugía no se congela de nuevo para el uso futuro. Todo el tejido restante se desecha apropiadamente después de la cirugía.

Se utiliza un colador para contener el tejido

durante el proceso de decantación. Esto permite que la solución de crioconservación y el producto enjuagado sean retirados del tejido mientras se minimiza cualquier contaminación posible del tejido durante la preparación (minimiza el contacto con humanos). Opcionalmente se utiliza una gasa para contener el tejido durante el proceso de decantación/descongelamiento.

Como se describiera en detalle anteriormente, las células madre derivadas de tejido adiposo poseen el potencial para diferenciarse en una amplia variedad de tipos de células que incluyen, pero no están limitados a, células nerviosas, astrocitos, células grasas, células condrogénicas, células osteogénicas o células pancreáticas de liberación de insulina.

II. Tejido Fuente: Dermis

Las matrices acelulares derivadas de la dermis pueden tener formas tales como láminas, mallas, partículas y otras formas. Como láminas o mallas, éstas se pueden utilizar para reparar o proporcionar soporte para otros tejidos membranosos. Algunas aplicaciones específicas para láminas o mallas incluyen el uso como cabestrillos para la reconstrucción de mamas, la aplicación a heridas o quemaduras donde la piel ha sido destruida o extirpada, la aplicación como un parche para reparar perforaciones, como

un soporte para tejidos debilitados o para cubrir aberturas en tejidos nativos. En formas particuladas, se pueden inyectar como un agente de carga (por ejemplo, para restaurar contornos naturales para tejidos dañados o desgastados) o se pueden aplicar a heridas en una pasta, suspensión espesa o forma seca para facilitar la regeneración de tejido dañado. Las matrices acelulares también se pueden utilizar para suministrar células precursoras y/o factores tejidogénicos para la reparación o regeneración de dermis u otros tipos de tejido. Se pretende que el sumario anterior de usos sea representativo y no limite la variedad de usos para matrices acelulares derivadas de dermis de acuerdo con modalidades de la presente invención.

Ejemplo 7: Descelularización de Tejido Utilizando una Solución Hipertónica

Una muestra de tejido de piel se aísla de un donador adecuado y se inspecciona por el daño (por ejemplo, agujeros o rasgaduras), y cualidades distintivas (por ejemplo, lunares, verrugas, tatuajes), las cuales se remueven con un bisturí. El tejido se inspecciona por cabello, y algo del mismo se retira utilizando fórceps. Donde el tejido procesado se debe utilizar en la forma de tiras o láminas, el tejido se inspecciona por un espesor

uniforme. De otra manera, el tejido se puede reducir en tamaño (por ejemplo, por medio de la molienda o desmenuzamiento). La epidermis se retira antes del procesamiento adicional de la dermis.

Una muestra de dermis se mide en un matraz y una solución hipertónica (por ejemplo, NaCl 1 M) se agrega en una relación 2:1. La mezcla se agita mecánicamente durante por lo menos 12 horas a temperatura ambiente. Después de la agitación, la solución hipertónica se decanta y la dermis se captura en un tamiz de 212 μm a 300 μm. La dermis recuperada se regresa al matraz y se remoja en una solución de surfactante al 0.1% con agitación mecánica durante por lo menos 12 horas a temperatura ambiente.

Después del último enjuague con agua, la dermis se remoja en una solución esterilizante, con agitación mecánica. Una solución esterilizante adecuada sería de 0.5% a 1.0% de ácido peracético en una mezcla de agua, etanol y propilenglicol. Uno o más remojos adicionales en solución esterilizante pueden ser necesarios para esterilizar adecuadamente el tejido adiposo. Después del remojo esterilizante final, la dermis se enjuaga repetidamente en agua desionizada para retirar cualquier rastro de solución esterilizante del tejido.

Después del enjuague final con agua, la dermis se almacena bajo refrigeración o se congela, o se sujeta a

pasos de procesamiento adicionales, tal como deslipidización, la cual se puede realizar por medio del método del Ejemplo 3, el método del Ejemplo 4, el paso de deslipidización del Ejemplo 5 u otros métodos dados a conocer en este documento.

Ejemplo 8: Particularización de una Dermis Descelularizada

Una muestra de dermis se descelulariza como en el Ejemplo 7, anterior. La muestra entonces se liofiliza de acuerdo con un proceso comercialmente disponible.

La dermis liofilizada entonces se muele a una forma particulada. Ésta se puede moler adicionalmente en un estado congelado (por ejemplo, molienda de impacto o molienda en estado congelado) para reducir adicionalmente el tamaño de partícula del tejido y para producir un tejido particulado fluido. Los protocolos de molienda adecuados son conocidos en el campo.

El tejido particulado se puede empacar en un recipiente estéril para el uso posterior, o se puede descongelar y rehidratar inmediatamente. En un método de rehidratación, una cantidad deseada de tejido particulado descongelado se agrega a una primera jeringa. La cantidad deseada de fluido (por ejemplo, un portador) se agrega a una segunda jeringa y las jeringas se unen entre sí utilizando una tapa de acoplamiento de hembra a hembra. El

fluido se expulsa lentamente dentro de la jeringa rellena de tejido, mientras que se oprimen los émbolos de ambas jeringas. La totalidad de la mezcla de tejido y fluido se transfiere a una de las jeringas y la otra se desecha. A la jeringa que contiene la mezcla se le coloca un tapón y se empaca en una hoja delgada de metal y/o una bolsita Kapak[MR] (Kapak Corporation, St. Louis Park, MN).

* * *

Se entenderá que las modalidades descritas en este documento son solamente ejemplares y que una persona de experiencia ordinaria en el campo puede hacer muchas variaciones y modificaciones sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. Se pretende que todas estas variaciones y modificaciones sean incluidas dentro del alcance de la invención, como se define por las reivindicaciones anexas.

REIVINDICACIONES

1. Una composición, caracterizada porque comprende un tejido adiposo descelularizado, deslipidado.

2. La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque el tejido adiposo está sustancialmente libre de lípidos nativos.

3. La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque el tejido adiposo está sustancialmente libre de componentes celulares nativos.

4. La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque el tejido adiposo está sustancialmente libre de ácidos nucleicos nativos.

5. La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque comprende además células tejidogénicas exógenas.

6. La composición de conformidad con la reivindicación 5, caracterizada porque las células tejidogénicas exógenas incluyen células madre exógenas.

7. La composición de conformidad con la reivindicación 5, caracterizada porque las células tejidogénicas exógenas incluyen células madre derivadas de tejido adiposo.

8. La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque comprende además por

lo menos una sustancia inductiva del crecimiento exógena.

9. La composición de conformidad con la reivindicación 8, caracterizada porque por lo menos la sustancia inductiva del crecimiento exógena se selecciona del grupo que consiste en proteínas morfogénicas óseas, factor de crecimiento endotelial vascular, factor de crecimiento de fibroblastos básico, factor de crecimiento transformante beta, factor de crecimiento derivado de plaquetas y factor de crecimiento epidérmico neuronal-similar 1.

10. La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque el tejido adiposo descelularizado, deslipidado está sustancialmente libre de sustancias que poseen un riesgo significativo de causar una respuesta inmunogénica en un paciente que recibe la composición.

11. La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque comprende además un portador para el tejido adiposo descelularizado, deslipidado.

12. La composición de conformidad con la reivindicación 11, caracterizada porque el portador incluye una sustancia seleccionada del grupo que consiste de una solución isotónica, solución de cloruro de sodio, solución de Ringer con lactato, solución salina amortiguada con

fosfato, plasma rico en plaquetas, ácido hialurónico, derivado de ácido hialurónico, hialuronato de sodio, trombina, fibrina, glicerina, colágeno, lecitina, azúcares, polisacáridos y soluciones de los mismos.

13. La composición de conformidad con la reivindicación 11, caracterizada porque el portador incluye una sustancia seleccionada del grupo que consiste de polisacáridos, ácidos nucleicos, carbohidratos, proteínas, polipéptidos, ácidos poli(α-hidroxi), poli(lactonas), poli(aminoácidos), poli(anhídridos), poli(ortoésteres), poli(anhídrido-co-imidas), poli(ortocarbonatos), poli(α-hidroxi-alcanoatos), poli(dioxanonas), poli(fosfoésteres), poli(L-lactida) (PLLA), poli(D,L-lactida) (PDLLA), poliglicólido (PGA), poli(lactida-co-glicólido (PLGA), poli(L-lactida-co-D,L-lactida), poli(D,L-lactida-co-trimetilen-carbonato), polihidroxibutirato (PHB), poli(ε-caprolactona), poli(δ-valerolactona), poli(γ-butirolactona), poli(caprolactona), ácido poliacrílico, ácido policarboxílico, clorhidrato de poli(alilamina), cloruro de poli(dialildimetilamonio), poli(etilenimina), fumarato de polipropileno, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, polietileno, polimetilmetacrilato, fibras de carbono, poli(etilenglicol), óxido de poli(etileno), alcohol poli(vinílico), poli(vinilpirrolidona), poli(etiloxazolina), copolímeros de

bloque de óxido de poli(etileno)-co-óxido de poli(propileno), poli(etilentereftalato)poliamida y copolímeros de los mismos.

14. Un tejido adiposo descelularizado, deslipidado.

15. Un método para preparar una matriz derivada de tejido adiposo, caracterizado porque comprende el paso que consiste en descelularizar un tejido adiposo deslipidado.

16. Un método para preparar una matriz derivada de tejido adiposo, caracterizado porque comprende los pasos separados que consisten en deslipidar el tejido adiposo y descelularizar el tejido adiposo deslipidado.

17. Un método para preparar una matriz derivada de tejido adiposo, caracterizado porque comprende los pasos que consisten en: obtener un tejido adiposo; reducir el tamaño del tejido adiposo; deslipidar el tejido adiposo reducido mecánicamente con un solvente orgánico polar; descelularizar el tejido adiposo deslipidado con una solución de detergente; y desinfectar el tejido adiposo descelularizado, deslipidado.

18. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque incluye los pasos adicionales que consisten en secar el tejido adiposo desinfectado; y reducir el tejido adiposo seco a una forma

particulada seca.

19. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el paso que consiste en reducir el tamaño del tejido adiposo incluye un paso que consiste en moler el tejido adiposo.

20. El método de conformidad con la reivindicación 19, caracterizado porque el paso que consiste en moler el tejido adiposo incluye un paso que consiste en moler el tejido adiposo con una placa de molienda gruesa, seguido por un paso que consiste en moler el tejido adiposo molido con una placa de molienda fina.

21. El método de conformidad con la reivindicación 19, caracterizado porque incluye el paso adicional que consiste en separar mecánicamente una capa de lípidos del tejido adiposo molido después del paso de molienda.

22. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el solvente orgánico polar se selecciona de un grupo de solventes polares que consisten de un solvente polar que tiene un átomo de carbono, un solvente polar que tiene dos átomos de carbono, un solvente polar que tiene tres átomos de carbono, un solvente polar que tiene cuatro átomos de carbono, un solvente polar que tiene cinco átomos de carbono y un solvente polar que tiene seis átomos de

carbono.

23. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el solvente orgánico polar incluye un alcohol.

24. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el solvente orgánico polar se selecciona del grupo que consiste en una parafina, hidrocarburo aromático, hidrocarburo cíclico, hidrocarburo clorado, hidrocarburo fluorado, metano clorado, metano fluorado, alcohol, éter, cetona, aldehído, éster, ácido orgánico y combinaciones de los mismos.

25. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el paso de deslipidación incluye el paso que consiste en lavar el tejido adiposo reducido mecánicamente con el solvente orgánico polar.

26. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el paso de deslipidación incluye el paso que consiste en combinar el tejido adiposo reducido mecánicamente con el solvente orgánico polar.

27. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el paso de deslipidación incluye el paso que consiste en homogenizar el tejido adiposo reducido mecánicamente con el solvente

orgánico polar.

28. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el paso de descelularización incluye un paso que consiste en lavar el tejido adiposo deslipidado con una solución de detergente.

29. El método de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque la solución de detergente incluye por lo menos un ácido desoxicólico o una sal de desoxicolato.

30. El método de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque la solución de detergente tiene una concentración de detergente en el intervalo de 0.1% a 5.0%.

31. El método de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque la solución de detergente incluye una mezcla de agua y alcohol.

32. El método de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque el alcohol está presente en la solución de detergente en una cantidad en el intervalo de 20% a 40% en volumen.

33. El método de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque el alcohol está presente en la solución de detergente en una cantidad en el intervalo de 60% a 80% en volumen.

34. El método de conformidad con la

reivindicación 17, caracterizado porque incluye además el paso que consiste en poner en contacto el tejido adiposo descelularizado, deslipidado con una solución que tiene un pH ácido con el fin de formar un gel.

35. El método de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque el paso de contacto incluye el paso que consiste en combinar el tejido adiposo descelularizado, deslipidado con la solución ácida.

36. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque incluye además el paso que consiste en combinar el tejido adiposo desinfectado en un líquido polar, por lo cual el líquido adiposo desinfectado y el líquido polar forman un gel fluido.

37. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el paso de desinfección incluye el paso que consiste en poner en contacto el tejido adiposo descelularizado, deslipidado con una solución desinfectante.

38. El método de conformidad con la reivindicación 32, caracterizado porque el paso de contacto incluye el paso que consiste en remojar el tejido adiposo descelularizado, deslipidado en la solución desinfectante.

39. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el paso de

desinfección incluye el paso que consiste en combinar el tejido adiposo descelularizado, deslipidado con la solución desinfectante.

40. El método de conformidad con la reivindicación 39, caracterizado porque la solución desinfectante es una solución ácida.

41. El método de conformidad con la reivindicación 40, caracterizado porque la solución desinfectante incluye ácido peracético.

42. El método de conformidad con la reivindicación 37, caracterizado porque la solución desinfectante incluye un alcohol.

43. El método de conformidad con la reivindicación 42, caracterizado porque la solución desinfectante incluye además un glicol.

44. El método de conformidad con la reivindicación 37, caracterizado porque el paso de desinfección incluye el paso que consiste en lavar el tejido adiposo desinfectado con un amortiguador que tiene un pH fisiológico después del paso de contacto.

45. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el paso de secado incluye el paso que consiste en secar el tejido adiposo desinfectado en aire.

46. El método de conformidad con la

reivindicación 17, caracterizado porque el paso de secado incluye el paso que consiste en secar el tejido adiposo desinfectado con calor.

47. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el paso de secado incluye el paso que consiste en liofilizar el tejido adiposo desinfectado.

48. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el paso de reducción del tamaño del tejido adiposo seco incluye el paso que consiste en moler el tejido adiposo seco, produciendo de ese modo un material particulado seco.

49. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque incluye el paso adicional que consiste en empacar el material particulado seco en una forma particulada seca.

50. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el paso de reducción del tamaño del tejido adiposo seco incluye el paso que consiste en moler en estado congelado el tejido adiposo seco, produciendo de ese modo un material particulado seco congelado.

51. El método de conformidad con la reivindicación 50, caracterizado porque incluye el paso adicional que consiste en descongelar el material

particulado seco congelado.

52. El método de conformidad con la reivindicación 51, caracterizado porque incluye el paso adicional que consiste en empacar el material particulado seco descongelado en una forma particulada seca.

53. El método de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque incluye los pasos adicionales que consisten en rehidratar el material particulado seco y mezclar el material particulado rehidratado con un portador.

54. El método de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque incluye los pasos adicionales que consisten en rehidratar el material particulado seco y sembrar el material particulado rehidratado con células tejidogénicas exógenas para formar un material de andamio sembrado.

55. El método de conformidad con la reivindicación 54, caracterizado porque incluye el paso adicional que consiste en empacar el material de andamio sembrado en un crioconservador.

56. Un método para preparar una matriz derivada de tejido adiposo, caracterizado porque comprende el paso que consiste en procesar un tejido adiposo para retirar sustancialmente todo el material lipídico y celular del tejido adiposo, el paso de procesamiento incluye el paso

que consiste en poner en contacto el tejido adiposo con un solvente orgánico polar y el paso que consiste en poner en contacto el tejido adiposo con una solución de detergente después del paso de contacto del tejido adiposo con un solvente orgánico polar.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Una matriz derivada de tejido suave acelular incluye un tejido colagenoso que ha sido deslipidado y descelularizado. El tejido adiposo está entre los tejidos suaves que son adecuados para manufacturar una matriz derivada de tejido suave acelular. Las células tejidogénicas exógenas y otros factores biológicamente activos se pueden agregar a la matriz acelular. La matriz acelular se puede proporcionar como partículas, una suspensión espesa, una pasta, un gel o en alguna otra forma. La matriz acelular se puede proporcionar como un andamio tridimensional que ha sido reconstituido a partir de partículas del tejido tridimensional. El andamio tridimensional puede tener la configuración de una cualidad anatómica y puede servir como una plantilla para la reparación o el reemplazo de tejido. Un método para hacer una matriz derivada de tejido suave acelular incluye los pasos que consisten en retirar lípido del tejido suave por medio de la extracción con solvente y la descelularización química del tejido suave.

REIVINDICACIONES

1. Una composición, caracterizada porque comprende un tejido adiposo descelularizado, deslipidado.

2. La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque el tejido adiposo está sustancialmente libre de lípidos nativos.

3. La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque el tejido adiposo está sustancialmente libre de componentes celulares nativos.

4. La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque el tejido adiposo está sustancialmente libre de ácidos nucleicos nativos.

5. La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque comprende además células tejidogénicas exógenas.

6. La composición de conformidad con la reivindicación 5, caracterizada porque las células tejidogénicas exógenas incluyen células madre exógenas.

7. La composición de conformidad con la reivindicación 5, caracterizada porque las células tejidogénicas exógenas incluyen células madre derivadas de tejido adiposo.

8. La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque comprende además por

lo menos una sustancia inductiva del crecimiento exógena.

9. La composición de conformidad con la reivindicación 8, caracterizada porque por lo menos la sustancia inductiva del crecimiento exógena se selecciona del grupo que consiste en proteínas morfogénicas óseas, factor de crecimiento endotelial vascular, factor de crecimiento de fibroblastos básico, factor de crecimiento transformante beta, factor de crecimiento derivado de plaquetas y factor de crecimiento epidérmico neuronal-similar 1.

10. La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque el tejido adiposo descelularizado, deslipidado está sustancialmente libre de sustancias que poseen un riesgo significativo de causar una respuesta inmunogénica en un paciente que recibe la composición.

11. La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque comprende además un portador para el tejido adiposo descelularizado, deslipidado.

12. La composición de conformidad con la reivindicación 11, caracterizada porque el portador incluye una sustancia seleccionada del grupo que consiste de una solución isotónica, solución de cloruro de sodio, solución de Ringer con lactato, solución salina amortiguada con

fosfato, plasma rico en plaquetas, ácido hialurónico, derivado de ácido hialurónico, hialuronato de sodio, trombina, fibrina, glicerina, colágeno, lecitina, azúcares, polisacáridos y soluciones de los mismos.

13. La composición de conformidad con la reivindicación 11, caracterizada porque el portador incluye una sustancia seleccionada del grupo que consiste de polisacáridos, ácidos nucleicos, carbohidratos, proteínas, polipéptidos, ácidos poli(α-hidroxi), poli(lactonas), poli(aminoácidos), poli(anhídridos), poli(ortoésteres), poli(anhídrido-co-imidas), poli(ortocarbonatos), poli(α-hidroxi-alcanoatos), poli(dioxanonas), poli(fosfoésteres), poli(L-lactida) (PLLA), poli(D,L-lactida) (PDLLA), poliglicólido (PGA), poli(lactida-co-glicólido (PLGA), poli(L-lactida-co-D,L-lactida), poli(D,L-lactida-co-trimetilen-carbonato), polihidroxibutirato (PHB), poli(ε-caprolactona), poli(δ-valerolactona), poli(γ-butirolactona), poli(caprolactona), ácido poliacrílico, ácido policarboxílico, clorhidrato de poli(alilamina), cloruro de poli(dialildimetilamonio), poli(etilenimina), fumarato de polipropileno, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, polietileno, polimetilmetacrilato, fibras de carbono, poli(etilenglicol), óxido de poli(etileno), alcohol poli(vinílico), poli(vinilpirrolidona), poli(etiloxazolina), copolímeros de

bloque de óxido de poli(etileno)-co-óxido de poli(propileno), poli(etilentereftalato)poliamida y copolímeros de los mismos.

14. Un tejido adiposo descelularizado, deslipidado.

15. Un método para preparar una matriz derivada de tejido adiposo, caracterizado porque comprende el paso que consiste en descelularizar un tejido adiposo deslipidado.

16. Un método para preparar una matriz derivada de tejido adiposo, caracterizado porque comprende los pasos separados que consisten en deslipidar el tejido adiposo y descelularizar el tejido adiposo deslipidado.

17. Un método para preparar una matriz derivada de tejido adiposo, caracterizado porque comprende los pasos que consisten en: obtener un tejido adiposo; reducir el tamaño del tejido adiposo; deslipidar el tejido adiposo reducido mecánicamente con un solvente orgánico polar; descelularizar el tejido adiposo deslipidado con una solución de detergente; y desinfectar el tejido adiposo descelularizado, deslipidado.

18. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque incluye los pasos adicionales que consisten en secar el tejido adiposo desinfectado; y reducir el tejido adiposo seco a una forma

particulada seca.

19. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el paso que consiste en reducir el tamaño del tejido adiposo incluye un paso que consiste en moler el tejido adiposo.

20. El método de conformidad con la reivindicación 19, caracterizado porque el paso que consiste en moler el tejido adiposo incluye un paso que consiste en moler el tejido adiposo con una placa de molienda gruesa, seguido por un paso que consiste en moler el tejido adiposo molido con una placa de molienda fina.

21. El método de conformidad con la reivindicación 19, caracterizado porque incluye el paso adicional que consiste en separar mecánicamente una capa de lípidos del tejido adiposo molido después del paso de molienda.

22. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el solvente orgánico polar se selecciona de un grupo de solventes polares que consisten de un solvente polar que tiene un átomo de carbono, un solvente polar que tiene dos átomos de carbono, un solvente polar que tiene tres átomos de carbono, un solvente polar que tiene cuatro átomos de carbono, un solvente polar que tiene cinco átomos de carbono y un solvente polar que tiene seis átomos de

carbono.

23. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el solvente orgánico polar incluye un alcohol.

24. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el solvente orgánico polar se selecciona del grupo que consiste en una parafina, hidrocarburo aromático, hidrocarburo cíclico, hidrocarburo clorado, hidrocarburo fluorado, metano clorado, metano fluorado, alcohol, éter, cetona, aldehído, éster, ácido orgánico y combinaciones de los mismos.

25. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el paso de deslipidación incluye el paso que consiste en lavar el tejido adiposo reducido mecánicamente con el solvente orgánico polar.

26. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el paso de deslipidación incluye el paso que consiste en combinar el tejido adiposo reducido mecánicamente con el solvente orgánico polar.

27. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el paso de deslipidación incluye el paso que consiste en homogenizar el tejido adiposo reducido mecánicamente con el solvente

orgánico polar.

28. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el paso de descelularización incluye un paso que consiste en lavar el tejido adiposo deslipidado con una solución de detergente.

29. El método de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque la solución de detergente incluye por lo menos un ácido desoxicólico o una sal de desoxicolato.

30. El método de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque la solución de detergente tiene una concentración de detergente en el intervalo de 0.1% a 5.0%.

31. El método de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque la solución de detergente incluye una mezcla de agua y alcohol.

32. El método de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque el alcohol está presente en la solución de detergente en una cantidad en el intervalo de 20% a 40% en volumen.

33. El método de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque el alcohol está presente en la solución de detergente en una cantidad en el intervalo de 60% a 80% en volumen.

34. El método de conformidad con la

reivindicación 17, caracterizado porque incluye además el paso que consiste en poner en contacto el tejido adiposo descelularizado, deslipidado con una solución que tiene un pH ácido con el fin de formar un gel.

35. El método de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque el paso de contacto incluye el paso que consiste en combinar el tejido adiposo descelularizado, deslipidado con la solución ácida.

36. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque incluye además el paso que consiste en combinar el tejido adiposo desinfectado en un líquido polar, por lo cual el líquido adiposo desinfectado y el líquido polar forman un gel fluido.

37. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el paso de desinfección incluye el paso que consiste en poner en contacto el tejido adiposo descelularizado, deslipidado con una solución desinfectante.

38. El método de conformidad con la reivindicación 32, caracterizado porque el paso de contacto incluye el paso que consiste en remojar el tejido adiposo descelularizado, deslipidado en la solución desinfectante.

39. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el paso de

desinfección incluye el paso que consiste en combinar el tejido adiposo descelularizado, deslipidado con la solución desinfectante.

40. El método de conformidad con la reivindicación 39, caracterizado porque la solución desinfectante es una solución ácida.

41. El método de conformidad con la reivindicación 40, caracterizado porque la solución desinfectante incluye ácido peracético.

42. El método de conformidad con la reivindicación 37, caracterizado porque la solución desinfectante incluye un alcohol.

43. El método de conformidad con la reivindicación 42, caracterizado porque la solución desinfectante incluye además un glicol.

44. El método de conformidad con la reivindicación 37, caracterizado porque el paso de desinfección incluye el paso que consiste en lavar el tejido adiposo desinfectado con un amortiguador que tiene un pH fisiológico después del paso de contacto.

45. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el paso de secado incluye el paso que consiste en secar el tejido adiposo desinfectado en aire.

46. El método de conformidad con la

reivindicación 17, caracterizado porque el paso de secado incluye el paso que consiste en secar el tejido adiposo desinfectado con calor.

47. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el paso de secado incluye el paso que consiste en liofilizar el tejido adiposo desinfectado.

48. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el paso de reducción del tamaño del tejido adiposo seco incluye el paso que consiste en moler el tejido adiposo seco, produciendo de ese modo un material particulado seco.

49. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque incluye el paso adicional que consiste en empacar el material particulado seco en una forma particulada seca.

50. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el paso de reducción del tamaño del tejido adiposo seco incluye el paso que consiste en moler en estado congelado el tejido adiposo seco, produciendo de ese modo un material particulado seco congelado.

51. El método de conformidad con la reivindicación 50, caracterizado porque incluye el paso adicional que consiste en descongelar el material

particulado seco congelado.

52. El método de conformidad con la reivindicación 51, caracterizado porque incluye el paso adicional que consiste en empacar el material particulado seco descongelado en una forma particulada seca.

53. El método de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque incluye los pasos adicionales que consisten en rehidratar el material particulado seco y mezclar el material particulado rehidratado con un portador.

54. El método de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque incluye los pasos adicionales que consisten en rehidratar el material particulado seco y sembrar el material particulado rehidratado con células tejidogénicas exógenas para formar un material de andamio sembrado.

55. El método de conformidad con la reivindicación 54, caracterizado porque incluye el paso adicional que consiste en empacar el material de andamio sembrado en un crioconservador.

56. Un método para preparar una matriz derivada de tejido adiposo, caracterizado porque comprende el paso que consiste en procesar un tejido adiposo para retirar sustancialmente todo el material lipídico y celular del tejido adiposo, el paso de procesamiento incluye el paso

que consiste en poner en contacto el tejido adiposo con un solvente orgánico polar y el paso que consiste en poner en contacto el tejido adiposo con una solución de detergente después del paso de contacto del tejido adiposo con un solvente orgánico polar.

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

APRIL 15, 2015

PTAS

GREENBERG TRAURIG, LLP
200 PARK AVENUE
FLORHAM PARK, NJ 07932

503263628

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 04/14/2015

REEL/FRAME: 035407/0336
NUMBER OF PAGES: 8

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNORS INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

DOCKET NUMBER: 103248-026601

ASSIGNOR:
HUANG, YEN-CHEN

DOC DATE: 10/10/2014

ASSIGNOR:
IVERY, ASIA

DOC DATE: 10/20/2014

ASSIGNOR:
CHOI, BRIAN

DOC DATE: 04/02/2015

ASSIGNOR:
SCHILLING, BENJAMIN

DOC DATE: 09/16/2014

ASSIGNOR:
NGO, MANH-DAN

DOC DATE: 10/07/2014

ASSIGNEE:
MUSCULOSKELETAL TRANSPLANT
FOUNDATION
125 MAY STREET, SUITE 300
EDISON CORPORATE CENTER
EDISON, NEW JERSEY 08837

APPLICATION NUMBER: 14446629 FILING DATE: 07/30/2014
PATENT NUMBER: ISSUE DATE:
TITLE: ACELLULAR SOFT TISSUE-DERIVED MATRICES AND METHODS FOR PREPARING SAME

APPLICATION NUMBER: 61860043 FILING DATE: 07/30/2013
PATENT NUMBER: ISSUE DATE:
TITLE: ACELLULAR SOFT TISSUE-DERIVED MATRICES AND METHODS FOR PREPARING SAME

APPLICATION NUMBER: FILING DATE: 07/30/2014
PATENT NUMBER: ISSUE DATE:
PCT NUMBER: US1448797
TITLE: ACELLULAR SOFT TISSUE-DERIVED MATRICES AND METHODS FOR PREPARING SAME

ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH
PUBLIC RECORDS DIVISION

ASSIGNMENT

WHEREAS, WE, YEN-CHEN HUANG, residing at 9 Vista court, East Brunswick, New Jersey 08816; ASIA IVERY, residing at 1088 Eastside Harbour Road, Boylston, Nova Scotia, Canada BOH 1GO; BRYAN CHOI, residing at 1980 Northstar Way #368, San Marcos, California 92078; BENJAMIN SCHILLING, residing at 162 Steuben Street, Apt. 3, Jersey City, New Jersey 07302 and MANH-DAN NGO, residing at 19 Angelica Court, Matawan, New Jersey 07747 (hereinafter "Assignors"); have invented new and original ACELLULAR SOFT TISSUE-DERIVED MATRICES AND METHODS FOR PREPARING SAME for which United States Patent Application Serial No. 14/446,629 filed on July 30, 2014; for which International Patent Application No. PCT/US2014/048797 was filed on July 30, 2014, and for which United States Provisional Patent Application No. 61/860,043 was filed on July 30, 2013;

WHEREAS, MUSCULOSKELETAL TRANSPLANT FOUNDATION, a not-for-profit corporation organized and existing under the laws of the District of Columbia and having a place of business at Edison Corporate Center, Suite 300, 125 May Street, Edison, New Jersey 08837, (hereinafter "Assignee") is desirous of acquiring all right, title and interest in and to said inventions, said patent applications and any Patent that may be granted thereon or therefrom.

NOW, THEREFORE, in consideration of One Dollar ($1.00) and other good and valuable consideration, the receipt of which is hereby acknowledged, Assignors hereby sell, assign and set over to said Assignee the entire right, title and interest in and for the United States of America and all other countries in and to said inventions and the aforesaid applications, all related original, non-provisional, divisional, continuation, continuation-in-part, substitute or reissue applications and patents applied for or granted therefor or therefrom in the United States of America and all other countries, and the Commissioner of Patents and Trademarks is hereby authorized and requested to issue all patents on said applications and/or applications resulting therefrom to said Assignee herein as assignee of the entire interest therein; and the undersigned for them and their legal representatives, heirs and assigns do hereby agree and covenant, without further remuneration, to execute and deliver all non-provisional, divisional, continuation, continuation-in-part, reissue, reexamination and other applications for patent on said inventions and all assignments thereof to said Assignee or its assigns, to communicate to said Assignee or its legal representatives all facts known to the undersigned respecting said inventions, to testify in any interferences or other legal proceedings in which any of said applications or patents may become involved, to sign all lawful papers, make all rightful oaths and to do generally everything necessary to aid said Assignee, its successors, assigns and nominees in obtaining patent protection on said inventions in all countries, the expenses incident to said applications to be borne and paid by said Assignee.

SIGNATURES START ON NEXT PAGE

Date: 10-10-14 By: _____
YEN-CHEN HUANG

State of NEW JERSEY

County of MIDDLESEX

On this 10th day of OCTOBER, 2014, before me personally came the above-named YEN-CHEN HUANG to me personally known as the individual who executed the foregoing instrument, who acknowledged to me the same was executed by him of his own free will for the uses and purposes therein mentioned.

Pamela M. Tice
Notary Public

PAMELA M. TICE
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
My Commission Expires 7/28/2018

Date: _____ By: _____
ASIA IVERY

State of _____

County of _____

On this ___ day of _____, 2014, before me personally came the above-named ASIA IVERY to me personally known as the individual who executed the foregoing instrument, who acknowledged to me the same was executed by her of her own free will for the uses and purposes therein mentioned.

_____
Notary Public

Date: _____ By:_____
YEN-CHEN HUANG

State of _____

County of _____

On this ___ day of _____, 2014, before me personally came the above-named YEN-CHEN HUANG to me personally known as the individual who executed the foregoing instrument, who acknowledged to me the same was executed by him of his own free will for the uses and purposes therein mentioned.

_____
Notary Public

* * * * *

Date: October 20, 2014 By: Asia Ivery
ASIA IVERY

Province
State of Nova Scotia

County of Guysborough

On this 20th day of October, 2014, before me personally came the above-named ASIA IVERY to me personally known as the individual who executed the foregoing instrument, who acknowledged to me the same was executed by her of her own free will for the uses and purposes therein mentioned.

_____
Notary Public

Date: 4-2-15 By: _____
BRYAN CHOI

State of NEW JERSEY

County of MIDDLESEX

On this 2 day of APRIL, 2015, before me personally came the above-named BRYAN CHOI to me personally known as the individual who executed the foregoing instrument, who acknowledged to me the same was executed by him of his own free will for the uses and purposes therein mentioned.

Pamela M. Tice 4/2/15
Notary Public

PAMELA M. TICE
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
My Commission Expires 7/28/2018

Date: _____ By: _____
BENJAMIN SCHILLING

State of _____

County of _____

On this ___ day of _____, 2014, before me personally came the above-named BENJAMIN SCHILLING to me personally known as the individual who executed the foregoing instrument, who acknowledged to me the same was executed by him of his own free will for the uses and purposes therein mentioned.

_____
Notary Public

Date: _____ By:_____
BRYAN CHOI

State of _____

County of _____

On this ___ day of _____, 2014, before me personally came the above-named BRYAN CHOI to me personally known as the individual who executed the foregoing instrument, who acknowledged to me the same was executed by him of his own free will for the uses and purposes therein mentioned.

_____
Notary Public

* * * * *

Date: 9/16/2014 By:_____
BENJAMIN SCHILLING

State of New Jersey

County of Middlesex

On this 16 day of September, 2014, before me personally came the above-named BENJAMIN SCHILLING to me personally known as the individual who executed the foregoing instrument, who acknowledged to me the same was executed by him of his own free will for the uses and purposes therein mentioned.

Pamela M. Tice
Notary Public

PAMELA M. TICE
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
My Commission Expires 7/28/2018

Date: 10/7/14

By: _____
MANH-DAN NGO

State of New Jersey

County of Middlesex

On this 7 day of October, 2014, before me personally came the above-named MANH-DAN NGO to me personally known as the individual who executed the foregoing instrument, who acknowledged to me the same was executed by her of her own free will for the uses and purposes therein mentioned.

_____
Notary Public

PAMELA M. TICE
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
My Commission Expires 7/28/2018

OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS
Subsecretario de Comercio para la Propiedad Intelectual y Director de la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

Abril 15 de 2015

GREENBERG TRAURIG, LLP
200 PARK AVENUE
FLORHAM PARK, NUEVA JERSEY 07932

503263628

Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos
Notificación de Registro de Documento de Cesión

El documento anexo ha sido registrado por la División de Cesiones de la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos. Una copia completa en microfilm está disponible en el cuarto de búsqueda de cesiones en el número de rollo y marco indicados abajo.

Por favor revise toda la información contenida en esta notificación. La información contenida en esta notificación de registro refleja los datos presentes en el sistema de cesiones de patentes y marcas. En caso de que usted encuentre algún error o tenga preguntas relacionadas con esta notificación, usted puede contactar al empleado cuyo nombre aparece en esta notificación al 571-272-3350. Por favor envíe la solicitud de corrección a: Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos, Sucursal de Servicios de Cesiones, P. O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313.

Fecha de registro: 04/14/2015 Rollo/Marco: 035407/0336
Número de páginas: 8

Expediente: Cesión del interés del cedente (ver documento para detalles).
Número de archivo: 103248-026601

Cedente:
HUANG, YEN-CHEN
Fecha del documento: 10/10/2014

Cedente:
IVERY, ASIA
Fecha del documento: 10/20/2014

Cedente:
CHOI, BRIAN
Fecha del documento: 04/02/2015

Cedente:
SCHILLING, BENJAMIN
Fecha del documento: 09/16/2014

Cedente:
NGO, MANH-DAN
Fecha del documento: 10/07/2014

Cesionario:
MUSCULOSKELETAL TRANSPLANT FOUNDATION
125 MAY STREET, OFICINA 300
EDISON CORPORATE CENTER
EDISION, NUEVA JERSEY 08837

Número de serie: 14446629 Fecha de presentación:
Número de patente: Fecha de expedición:
Título: MATRICES ACELULARES DERIVADAS DE TEJIDOS BLANDOS Y MÉTODOS PARA PREPARAR LAS MISMAS

Número de serie: 61860043 Fecha de presentación:
Número de patente: Fecha de expedición:
Título: MATRICES ACELULARES DERIVADAS DE TEJIDOS BLANDOS Y MÉTODOS PARA PREPARAR LAS MISMAS

Número de serie: Fecha de presentación:
Número de patente: Fecha de expedición:
Número PCT: US1448797
Título: MATRICES ACELULARES DERIVADAS DE TEJIDOS BLANDOS Y MÉTODOS PARA PREPARAR LAS MISMAS

Sucursal de Registro de Cesiones
División de Registros Públicos

_____

103248-026601

CESIÓN

CONSIDERANDO QUE NOSOTROS YEN-CHEN HUANG, residente en 9 Vista Court, East Brunswick, Nueva Jersey 08816; ASIA IVERY, residente en 1088 Eastside Harbour Road, Boylston, Nova Scotia, Canadá BOH 1GO; BRYAN CHOI, residente en 1980 Northstar Way # 368, San Marcos, California 92078; BENJAMÌN SCHILLING, residente en 162 Steuben Street, Apartamento 3, Ciudad de Jersey, Nueva Jersey 07302 y MANH-DAN NGO, residente en 19 Angélica Court, Matawan, Nueva Jersey 07747 (de ahora en adelante los "Cedentes") hemos inventado nuevas y originales MATRICES ACELULARES DERIVADAS DE TEJIDOS BLANDOS Y MÉTODOS PARA PREPARAR LAS MISMAS para la cual se presentó una Solicitud de Patente de los Estados Unidos con número de serie 14/446.629 el 30 de julio de 2014; para la cual se presentó una Solicitud de Patente Internacional con número PCT/US2014/048797 el 30 de julio de 2014; y para la cual se presentó una Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos con número de serie 61/860.043 el 30 de julio de 2013.

CONSIDERANDO QUE, **MUSCULOSKELETAL TRANSPLANT FOUNDATION,** una entidad sin ánimo de lucro, constituida y existente bajo las leyes del Distrito de Columbia y con su sede de negocios en Edison Corporate Center, Oficina 300, 125 May Street, Edison, Nueva Jersey 0883 (de ahora en adelante denominada el "Cesionario"), desea adquirir la totalidad del derecho, título e interés en y sobre dichas invenciones, dichas solicitudes de patente y cualquier Patente que pueda ser otorgada con base en las mismas y a partir de las mismas.

AHORA, POR LO TANTO, en contraprestación a un dólar ($1.00) y otras contraprestaciones onerosas, el recibo de las cuales es reconocido por medio del presente, los Cedentes por medio del presente venden, ceden y traspasan a dicho Cesionario la totalidad del derecho, título e interés en y para los Estados Unidos de América y todos los demás países en y sobre dichas invenciones y las mencionadas solicitudes, todas relacionadas con solicitudes y patentes originales, no provisionales, divisionales, continuaciones, continuaciones en parte, sustituciones o reexpediciones solicitadas u otorgadas con base en las mismas o a partir de las mismas en los Estados Unidos de América y todos los demás países, y por medio del presente se autoriza y se le solicita al Comisionado de Patentes y Marcas que expida todas las patentes sobre dichas solicitudes y/o solicitudes que resulten de las mismas a dicho Cesionario mencionado en el presente como el cesionario de la totalidad el interés en las mismas; y los suscritos para ellos y para sus representantes legales, herederos y asignatarios

por medio del presente aceptan y se comprometen, sin ninguna remuneración adicional, a ejecutar y entregar todas las solicitudes provisionales, divisionales, continuaciones, continuaciones en parte, reexpediciones, reexaminaciones y otras solicitudes de patente sobre dichas invenciones y todas las cesiones de las mismas al Cesionario o sus asignatarios, a comunicar a dicho Cesionario o sus representantes legales todos los hechos conocidos por los suscritos con respecto a dichas invenciones, a atestiguar en cualquier interferencia u otros procedimientos legales en los cuales cualquiera de dichas solicitudes o patentes puedan estar involucradas, a firmar todos los documentos legales, a hacer todos los juramentos legales y en general a hacer todo lo necesario para ayudarle al Cesionario, sus sucesores, asignatarios y nominados en la obtención de protección de patente sobre dichas invenciones en todos los países, los datos relacionados con dichas solicitudes a ser asumidos y pagados por dicho Cesionario.

LAS FIRMAS EMPIEZAN EN LA PÁGINA SIGUIENTE

NJ 228747346v1

Fecha: 10-10-14
Por: Firmado por firma ilegible - YEN CHEN HUANG

Estado de Nueva Jersey
Condado de Middlesex

En este día 10 de octubre de 2014, ante mí personalmente compareció el mencionado YEN-CHEN HUANG conocido por mí como el individuo que ejecutó el anterior instrumento, quien reconoció ante mí que el mismo fue ejecutado por él como un acto voluntario de su parte para los fines y propósitos mencionados en el mismo.

Firmado por firma ilegible - Notario Público
Sello: Pamela M. Tice, notario público de Nueva Jersey, mi comisión termina el 7/28/2018

Nota del traductor: Firma y notarización de ASIA IVERY no diligenciada, razón por la cual no se hace su traducción.

Nota del traductor: Firma y notarización de YEN CHEN HUANG no diligenciada, razón por la cual no se hace su traducción.

Fecha: Octubre 20 de 2014
Por: Firmado por firma ilegible - ASIA IVERY

Provincia de Nova Scotia
Condado de Guysborough

En este día 20 de octubre de 2014, ante mí personalmente compareció el mencionado ASI IVERY conocido por mí como el individuo que ejecutó el anterior instrumento, quien reconoció ante mí que el mismo fue ejecutado por ella como un acto voluntario de su parte para los fines y propósitos mencionados en el mismo.

Firmado por firma ilegible - Notario Público

NJ 228747346v1

Fecha: 4-2-15
Por: Firmado por firma ilegible - BRYAN CHOI

Estado de Nueva Jersey
Condado de Middlesex

En este día 2 de abril de 2015, ante mí personalmente compareció el mencionado BRYAN CHOI conocido por mí como el individuo que ejecutó el anterior instrumento, quien reconoció ante mí que el mismo fue ejecutado por él como un acto voluntario de su parte para los fines y propósitos mencionados en el mismo.

Firmado por firma ilegible - Notario Público
Sello: Pamela M. Tice, notario público de Nueva Jersey, mi comisión termina el 7/28/2018

Nota del traductor: Firma y notarización de BENJAMIN SCHILLING no diligenciada, razón por la cual no se hace su traducción.

NJ 228747346v1

Nota del traductor: Firma y notarización de BRYAN CHOI no diligenciada, razón por la cual no se hace su traducción.

Fecha: 09/16/2014
Por: Firmado por firma ilegible - BENJAMIN SCHILLING

Estado de Nueva Jersey
Condado de Middlesex

En este día 16 de septiembre de 2014, ante mí personalmente compareció el mencionado BENJAMIN SCHILLING conocido por mí como el individuo que ejecutó el anterior instrumento, quien reconoció ante mí que el mismo fue ejecutado por él como un acto voluntario de su parte para los fines y propósitos mencionados en el mismo.

Firmado por firma ilegible - Notario Público
Sello: Pamela M. Tice, notario público de Nueva Jersey, mi comisión termina el 7/28/2018

NJ 228747346v1

Fecha: 10/7/14
Por: Firmado por firma ilegible - MANH-DAN NGO

Estado de Nueva Jersey
Condado de Middlesex

En este día 7 de octubre de 2014, ante mí personalmente compareció el mencionado MANH-DAN NGO conocido por mí como el individuo que ejecutó el anterior instrumento, quien reconoció ante mí que el mismo fue ejecutado por él como un acto voluntario de su parte para los fines y propósitos mencionados en el mismo.

Firmado por firma ilegible - Notario Público
Sello: Pamela M. Tice, notario público de Nueva Jersey, mi comisión termina el 7/28/2018

NJ 228747346v1

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

SELITTO, Ralph, W., Jr.
Greenberg Traurig, LLP
200 Park Avenue
Florham Park, NJ 07932
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
07 October 2014 (07.10.2014)

Applicant's or agent's file reference
103248-026602

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2014/048797

International filing date *(day/month/year)*
30 July 2014 (30.07.2014)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address
HWANG, Yen-Chen
9 Vista Court
East Brunswick, NJ 08816
United States of America

State of Nationality: US
State of Residence: US
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address
HUANG, Yen-Chen
9 Vista Court
East Brunswick, NJ 08816
United States of America

State of Nationality: US
State of Residence: US
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☒ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 70 90

Authorized officer
Baechler Francois
e-mail pt01.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 01

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
5 February 2015 (05.02.2015)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2015/017500 A1

(51) International Patent Classification:
A61L 27/36 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2014/048797

(22) International Filing Date:
30 July 2014 (30.07.2014)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/860,043 30 July 2013 (30.07.2013) US

(71) Applicant: **MUSCULOSKELETAL TRANSPLANT FOUNDATION** [US/US]; 125 May Street, Suite 300, Edison Corporate Center, Edison, NJ 08837 (US).

(72) Inventors; and
(71) Applicants : **HUANG, Yen-Chen** [US/US]; 9 Vista Court, East Brunswick, NJ 08816 (US). **IVERY, Asia** [CA/CA]; 1088 Eastside Harbour Road, Boylston, NS B0H 1G0 (CA). **CHOI, Bryan** [US/US]; 1980 Northstar Way #368, San Marcos, CA 92078 (US). **SCHILLING, Benjamin** [US/US]; 162 Steuben Street Apt. 3, Jersey City, NJ 07302 (US). **NGO, Manh-Dan** [US/US]; 19 Angelica Ct., Matawan, NJ 07747 (US).

(74) Agent: **SELITTO, Ralph, W., Jr.**; Greenberg Traurig, LLP, 200 Park Avenue, Florham Park, NJ 07932 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[Continued on next page]

(54) Title: ACELLULAR SOFT TISSUE-DERIVED MATRICES AND METHODS FOR PREPARING SAME

(57) Abstract: An acellular soft tissue-derived matrix includes a collagenous tissue that has been delipidated and decellularized. Adipose tissue is among the soft tissues suitable for manufacturing an acellular soft tissue-derived matrix. Exogenous tissuegenic cells and other biologically-active factors may be added to the acellular matrix. The acellular matrix may be provided as particles, a slurry, a paste, a gel, or in some other form. The acellular matrix may be provided as a three-dimensional scaffold that has been reconstituted from particles of the three-dimensional tissue. The three-dimensional scaffold may have the shape of an anatomical feature and serve as a template for tissue repair or replacement. A method of making an acellular soft tissue-derived matrix includes steps of removing lipid from the soft tissue by solvent extraction and chemical decellularization of the soft tissue.

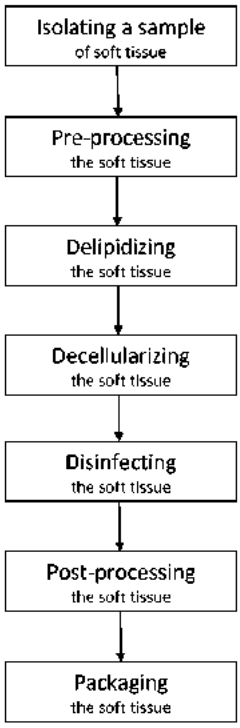


FIG. 1

WO 2015/017500 A1

(84) **Designated States** *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

ACELLULAR SOFT TISSUE-DERIVED MATRICES AND METHODS FOR PREPARING SAME

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATION

The present application claims the benefit of U.S. Provisional Patent Application No. 61/860,043, filed on July 30, 2013, the disclosure of which is incorporated by reference herein.

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates generally to matrices made from decellularized soft tissues, including adipose, dermis, fascia, muscle, pericardium, and other connective or membranous tissues, and in particular, to such matrices as are suitable for implantation into a living body in plastic surgery procedures, including reconstructive or cosmetic surgery procedures.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Techniques for restoring structure and function to damaged tissue are used routinely in the field of plastic surgery, including reconstructive and cosmetic surgery. Tissue transplantation is one way of restoring structure and function by replacing or rebuilding the damaged tissue. The transfer of biological material from one individual to another can raise significant risks. One such risk is tissue rejection, which can occur even in cases where there is a good histocompatibility match. The risk of tissue rejection can be reduced by processing tissues so that they become essentially free of cell components (e.g., cellular membranes, nucleic acids, lipids, and cytoplasmic components) that cause immunogenic responses. Such tissues are sometimes referred to as decellularized, cell-free, or acellular matrices. It is also desirable to retain the growth factors that are required to promote cellular ingrowth into the acellular matrix, eventually replacing the acellular matrix with the patient's native tissue.

In particular, injectable soft tissue fillers have expanded the non-surgical options available for volume replacement, facial defect filling and rejuvenation in the aging face. Injectable soft tissue fillers are widely used for both superficial and deep aesthetic

RECTIFIED SHEET (RULE 91) ISA/EP

applications, including lip augmentation or rejuvenation of the aging lip to restore shape and contour, fine line filling to reduce the appearance of wrinkles around the eyes or mouth, improvement of nasolabial folds, correction of eyelid deformities, volume filling for the cheek and jawline, and for deep wrinkle or scar filling.

There are many soft tissue fillers that are commercially available for these applications, and in general, fall within the following categories: autologous implant materials, collagens, hyaluronic acid (HA), and biosynthetic polymers. Durability of these materials varies from several weeks to years, or is considered permanent.

SUMMARY OF THE INVENTION

Embodiments of the present invention relate generally to decellularized soft tissue-derived matrices (also referred to as "acellular matrices") suitable for use in plastic surgery procedures, including reconstructive and cosmetic procedures. The matrices may be derived from a number of types of mammalian tissues, including human tissues. Such types of tissues include, but are not limited to, adipose, dermis, fascia, muscle, pericardium, and other connective or membranous tissues. In embodiments of the present invention, the matrices are in the form of lyophilized (i.e., freeze-dried) particles. According to some embodiments of the present invention, the particles are rehydrated in a carrier for injection into a patient. According to some embodiments of the present invention, the matrices are autologous to the patient. In other embodiments, the tissues are allografts. In yet other embodiments, the matrices are xenografts. According to some embodiments of the present invention, the matrices are in the form of sheets or strips. In other embodiments of the present invention, the matrices are in a particulate form. In yet other embodiments of the present invention, the matrices are in the form of an injectable paste, gel, suspension, or slurry. According to some embodiments of the present invention, the matrices are in a lyophilized (i.e., freeze-dried) form. In other embodiments of the present invention, the matrices are in a rehydrated form. According to some embodiments, the matrices have been reseeded with cells. According to some embodiments of the present invention, factors for promoting and directing tissue ingrowth and differentiation (e.g., growth factors, such as VEGF or bFGF) have been added to the matrices.

Other embodiments of the present invention relate to a process for preparing acellular matrices from soft tissues. Some embodiments of the process include the steps of: (1) isolating a desired soft tissue obtained from a donor; (2) decellularizing the tissue by a process which includes soaking the isolated tissue in a hypertonic solution, soaking the isolated tissue in a surfactant, and soaking or rinsing the processed tissue in sterile water; (3) disinfecting the decellularized tissue; and (4) post-processing the tissue into a desired form. According to some embodiments of the process, the process includes a step of removing lipids from the isolated tissue (i.e., delipidizing/delipidating the tissue), which may be performed before decellularizing the isolated tissue. According to some embodiments of the process, the delipidization step is performed by agitating the isolated tissue in an alcohol.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

The present invention will be further explained with reference to the attached drawings, wherein:

FIG. 1 is a schematic flowchart illustrating a process of preparing an acellular soft tissue-derived matrix according to an embodiment of the present invention.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Detailed embodiments of the present invention are disclosed herein. It should be understood that the disclosed embodiments are merely illustrative of the invention that may be embodied in various forms. In addition, each of the examples given in connection with the various embodiments of the invention is intended to be illustrative, and not restrictive.

The present invention relates generally to matrices made from decellularized soft tissues, including, but not limited to, adipose, dermis, fascia, muscle, pericardia, and other connective or membranous tissues. Decellularized soft tissues, and methods of making same, are also disclosed in the co-owned U.S. Patent No. 7,723,108, issued May 25, 2010, which is incorporated herein by reference. Acellular matrices of the present invention in a particulate or slurry form may be used as bulking agents in

reconstructive or cosmetic surgery procedures (e.g., for filling voids in tissue or smoothing wrinkles), and as scaffolds for tissue repair and regeneration. In strip or sheet form, acellular matrices according to the present invention may be used to provide structural support to other tissues, and also to provide scaffolds for tissue repair and regeneration. Examples of procedures in which acellular matrices may be used include, but are not limited to, volume replacement, facial defect filling and rejuvenation in the aging face. Injectable acellular matrices may also be used for both superficial and deep aesthetic applications, including lip augmentation or rejuvenation of the aging lip to restore shape and contour, fine line filling to reduce the appearance of wrinkles around the eyes or mouth, improvement of nasolabial folds, correction of eyelid deformities, volume filling for the cheek and jawline, and for deep wrinkle or scar filling.

The term "soft tissues" refers generally to non-calcified tissues from the mammalian body. For the purposes of the present disclosure, such tissues include an adipose tissue, an amnion tissue, an artery tissue, a cartilage tissue, a connective tissue, a chorion tissue, a colon tissue, a non-calcified dental tissue, a dermal tissue, a duodenal tissue, an endothelial tissue, an epithelial tissue, a fascial tissue, a gastrointestinal tissue, a gingival tissue, a growth plate tissue, an intervertebral disc tissue, an intestinal mucosal tissue, an intestinal serosal tissue, a ligament tissue, a liver tissue, a lung tissue, a mammary tissue, a membranous tissue, a meniscal tissue, a muscle tissue, a nerve tissue, an ovarian tissue, a parenchymal organ tissue, a pericardial tissue, a periosteal tissue, a peritoneal tissue, a placental tissue, a skin tissue, a spleen tissue, a stomach tissue, a synovial tissue, a tendon tissue, a testes tissue, an umbilical cord tissue, a urological tissue, a vascular tissue, a vein tissue, and other non-calcified tissues.

TISSUE TYPES

Tissues from which the acellular matrices of the present invention may be formed, as well as tissues which may be augmented or repaired using such acellular matrices are described more fully hereinbelow.

1. Tissue Compartments

In multicellular organisms, cells that are specialized to perform common functions are usually organized into cooperative assemblies embedded in a complex network of secreted extracellular macromolecules (i.e., the extracellular matrix (ECM)), to form specialized tissue compartments. Individual cells in such tissue compartments are in contact with ECM macromolecules. The ECM helps hold the cells and compartments together and provides an organized lattice or scaffold within which cells can migrate and interact with one another. In many cases, cells in a compartment can be held in place by direct cell-cell adhesions. In vertebrates, such compartments may be of four major types, a connective tissue (CT) compartment, an epithelial tissue (ET) compartment, a muscle tissue (MT) compartment and a nervous tissue (NT) compartment, which are derived from three embryonic germ layers: ectoderm, mesoderm and endoderm. The NT and portions of the ET compartments are differentiated from the ectoderm; the CT, MT and certain portions of the ET compartments are derived from the mesoderm; and further portions of the ET compartment are derived from the endoderm.

1.1. Extracellular Matrix

The ECM is an intricate network of secreted extracellular macromolecules that largely fills the extracellular space in the tissue compartments and comprises large polymeric complexes of glycosaminoglycans (GAGs) and proteoglycans. GAGs are negatively charged unbranched polysaccharide chains comprising repeating disaccharide units. Each repeating disaccharide unit of a GAG chain contains an amino sugar (e.g., N-acetyl glucosamine), which in most cases is sulfated, and an -uronic acid (e.g., glucuronic or iduronic acid). Four main types of GAG molecules are distinguished based on sugar residues, type of linkage, number and location of sulfate groups: (1) hyaluronan; (2) chondroitan sulfate and dermatan sulfate; (3) heparan sulfate and heparin; and (4) keratin sulfate.

GAG chains are inflexible and tend to adopt extended conformations occupying a huge volume relative to their mass, forming gels even at low concentrations. Their high density of negative charges attracts cations, such as Na^+, that are effective in osmotic

absorption of large amounts of water into the matrix. This creates high turgor enabling the ECM to withstand compressive forces.

Hyaluronan (also termed hyaluronic acid or hyaluronate) (HA), which comprises a regular repeating sequence of up to 25,000 nonsulfated disaccharide units, serves many functions, many of which depend on the binding of HA-binding proteins and proteoglycans, which are either themselves constituents of the ECM or are integral constituents of cell surfaces. For example, HA resists compressive forces in joints as a major constituent of joint fluid serving as a lubricant; serves as a space filler during embryonic development; creates a cell-free space in the epithelial compartment to allow cell migration during the formation of heart, cornea and other organs; and plays a role in wound repair. Excess HA is usually degraded by hyaluronidase.

All GAGs, except for HA, are covalently linked to proteins in the form of proteoglycans. During their synthesis, the polypeptide chain of proteoglycans is synthesized on membrane-bound ribosomes and threaded into the lumen of endoplasmic reticulum, from which they are sorted in the Golgi apparatus, and assembled with polysaccharide chains. While still in the Golgi, proteoglycans undergo a series of sequential and coordinated sulfation and epimerization reactions to produce sulfated proteoglycans. Sulfated and nonsulfated proteoglycans then travel through the Golgi network and are ultimately secreted into the ECM by exocytosis with the help of secretory vesicles.

Proteoglycans are heterogenous molecules, with core proteins ranging in molecular weight from 10 kD to about 600 kD and with attached GAG chains varying in number and type, further modified by a complex variable pattern of sulfate groups. At least one of the proteoglycan sugar side chains is a GAG; the core protein is usually a glycoprotein, but may comprise up to 95% carbohydrate by weight, mostly as long unbranched GAG chains up to at least 80 sugar residues long.

Proteoglycans along with their attached GAG chains regulate the activities of secreted macromolecules. They can serve as selective molecular sieves regulating a size-based trafficking of molecules and cells, and play a role in cell-cell signaling.

Proteoglycans modulate the activities of secreted factors, such as growth factors and cytokines, by binding to them For example, binding of fibroblast growth factor (FGF) to heparan sulfate chains of proteoglycans is required for FGF activation of its cell surface receptors. On the other hand, for example, binding of a ubiquitous growth regulatory factor, such as transforming growth factor β (TGF-β) to core proteins of several ECM proteoglycans, such as decorin, results in inhibition of TGF-β activity. Proteoglycans also bind and regulate the activities of other types of secreted proteins, such as proteases and protease inhibitors. Cell-surface proteoglycans also may act as co-receptors: for example, syndecan binds to FGF and presents it to the FGF-receptor. Similarly, betaglycan binds to TGF-β and presents it to TGF-β receptors.

Collagens and elastin are the major fibrous proteins of the ECM. Collagens comprise a family of highly characteristic fibrous proteins and are a major component of skin and bone. Collagen fibers consist of globular units of the collagen subunit tropocollagen. Each tropocollagen subunit molecule comprises three polypeptide chains, called α chains, each exhibiting a left-handed helical conformation that are wrapped around each other in a right-handed coiled coil structure, also called a triple helix or super helix. A characteristic feature of collagen is a repeating tripeptide unit comprising Glycine-Proline-X or Glycine-X-Hydroxyproline, where X may be any amino acid. The presence of glycine at every third position in a collagen unit is critical for maintaining the coiled coil structure, since each repeating glycine residue sits on the interior axis of the helix, which sterically hinders bulkier side chains. Prolines and hydroxyprolines help stabilize the triple helix. Collagen is secreted as procollagen molecules, which undergo proteolytic processing and subsequent assembly to form collagenous fibrils. Collagens are highly glycosylated during protein trafficking through intracellular secretory pathways.

Collagens are classified into various types depending on the nature of their α chains. Table 1 lists types of collagen, composition, class and distribution. (Reproduced from Shoulders and Raines, Annu. Rev. Biochem. 2009, 78: 929-958 and Bailey's Textbook of Microscopic Anatomy, Kelly et al., Williams and Wilkins, 18th edition, 1984).

Table 1. Collagen Type, Class and Distribution

Collagen Type	Composition	Class	Distribution
I	$\alpha_1[I]_2\alpha_2[I]$	Fibrillar	Dermis, tendon, ligament, bone, cornea
II	$\alpha_1[II]_3$	Fibrillar	Cartilage, intervertebral disc, vitreous body
III	$\alpha_1[III]_3$	Fibrillar	Fetal skin, cardiovascular system, basal lamina, intestine.
IV	$\alpha_1[IV]_2\alpha_2[IV]$; $\alpha_3[IV]\alpha_4[IV]\alpha_5[IV]$; $\alpha_5[IV]_2\alpha_6[IV]$	Network	Basal lamina, external lamina
V	$\alpha_1[V]_3$; $\alpha_1[V]_2\alpha_2[V]$; $A_1[V]\alpha_2[V]\alpha_3[V]$	Fibrillar	Bone, dermis, cornea, placenta
VI	$\alpha_1[VI]\alpha_2[VI]\alpha_3[VI]$; $\alpha_1[VI]\alpha_2[VI]\alpha_4[VI]$	Network	Bone, cartilage, cornea, dermis
VII	$\alpha_1[VII]_2\alpha_2[VII]$	Anchoring fibril	Dermis, bladder
VIII	$\alpha_1[VIII]_3$; $\alpha_2[VIII]_3$; $\alpha_1[VIII]_2\alpha_2[VIII]$	Network	Dermis, brain, heart, kidney
IX	$\alpha_1[IX]\alpha_2[IX]\alpha_3[IX]$	FACIT[a]	Cartilage, cornea, vitreous
X	$\alpha_1[X]_3$	Network	Cartilage
XI	$\alpha_1[XI]\alpha_2[XI]\alpha_3[XI]$	Fibrillar	Cartilage, intervertebral disc
XII	$\alpha_1[XII]_3$	FACIT	Dermis, tendon
XIII	$\alpha_1[XIII]_3$	MACIT[a]	Endothelial cells, dermis, eye, heart
XIV	$\alpha_1[XIV]_3$	FACIT	Bone, dermis, cartilage
XV		MULTIPLEXIN[a]	Capillaries, testis, kidney, heart, bone
XVI		FACIT	Dermis, kidney
XVII	$\alpha_1[XVII]_3$	MACIT	Hemidesmosomes in epithelia
XVIII		MULTIPLEXIN	Basal lamina, liver
XIX		FACIT	Basal lamina
XX		FACIT	Cornea
XXI		FACIT	Stomach, kidney
XXII		FACIT	Tissue junctions
XXIII		MACIT	Heart, retina
XXIV		Fibrillar	Bone, cornea
XXV		MACIT	Brain, heart, testis
XXVI		FACIT	Testis, ovary
XXVII			Dermis, sciatic nerve
XXIX			Dermis

[a]Abbreviations: FACIT, fibril-associated collagen with interrupted triple helices; MACIT, membrane-associated collagen with interrupted triple helices; MULTIPLEXIN, multiple triple helix domains.

A network of elastic fibers in the ECM offers resilience and elasticity so that organs are able to recoil following transient stretch. Elastic fibers primarily comprise the fibrous protein elastin, a highly hydrophobic protein about 750 amino acids in length that is rich in proline and glycine, is not glycosylated and is low in hydroxyproline and hyroxylysine. Elastin molecules are secreted into the ECM and assemble into elastic fibers close to the plasma membrane. Upon secretion, elastin molecules become highly cross-linked to form an extensive network of fibers and sheets.

The ECM also comprises many non-collagen adhesive proteins, usually with multiple domains containing binding sites of other macromolecules and for cell-surface receptors. One such adhesive protein, fibronectin, is a large glycoprotein comprising two subunits joined by a pair of disulfide bonds near the carboxy termini. Each subunit is folded into a series of rod-like domains interspersed by regions of flexible polypeptide chains. Each domain further comprises repeating modules of various types. One major type of fibronectin repeating module, called type III fibronectin repeat, is about 90 amino acids in length and occurs at least 15 times in each subunit. Fibronectin type III repeats have characteristic Arg-Gly-Asp (RGD) tripeptide repeats that function as binding sites for other proteins such as collagen, heparin or cell surface receptors. Fibronectin not only plays an important role in cell adhesion to the ECM, but also in guiding cell migration in vertebrate embryos.

Laminin, another adhesive glycoprotein of the ECM, is a major constituent (along with type IV collagen and another glycoprotein, nidogen/entactin) of the basal lamina, a tough sheet of ECM formed at the base of epithelial cells. Laminin is a large flexible complex, about 850 kD in molecular weight, with three very long polypeptide chains arranged in the form of an asymmetric cross held together with disulfide bonds. Laminin contains numerous functional domains, e.g., one binds to type IV collagen, one

to heparan sulfate, one to entactin, and two or more to laminin receptor proteins on the cell surface.

1.2 Stem Cells

The term "stem cells" as used herein refers to undifferentiated cells having high proliferative potential with the ability to self-renew that can generate daughter cells that can undergo terminal differentiation into more than one distinct cell phenotype. Stem cells are distinguished from other cell types by two characteristics. First, they are unspecialized cells capable of renewing themselves through cell division, sometimes after long periods of inactivity. Second, under certain physiologic or experimental conditions, they can be induced to become tissue- or organ-specific cells with special functions. In some organs, such as the gut and bone marrow, stem cells regularly divide to repair and replace worn out or damaged tissues. In other organs, however, such as the pancreas and the heart, stem cells only divide under special conditions.

Embryonic stem cells (EmSC) are stem cells derived from an embryo that are pluripotent (i.e., they are able to differentiate in vitro into endodermal, mesodermal and ectodermal cell types).

Adult (somatic) stem cells are undifferentiated cells found among differentiated cells in a tissue or organ. Their primary role in vivo is to maintain and repair the tissue in which they are found. Adult stem cells have been identified in many organs and tissues, including brain, bone marrow, peripheral blood, blood vessels, skeletal muscles, skin, teeth, gastrointestinal tract, liver, ovarian epithelium, and testis. Adult stem cells are thought to reside in a specific area of each tissue, known as a stem cell niche, where they may remain quiescent (non-dividing) for long periods of time until they are activated by a normal need for more cells to maintain tissue, or by disease or tissue injury. Examples of adult stem cells include, but not limited to, hematopoietic stem cells, mesenchymal stem cells, neural stem cells, epithelial stem cells, and skin stem cells.

Hematopoietic Stem Cells (HSCs)

Hematopoietic stem cells (also known as the colony-forming unit of the myeloid and lymphoid cells (CFU-M,L), or CD34+ cells) are rare pluripotential cells within the blood-forming organs that are responsible for the continued production of blood cells during life. While there is no single cell surface marker exclusively expressed by hematopoietic stem cells, it generally has been accepted that human HSCs have the following antigenic profile: CD 34+, CD59+, Thy1+(CD90), CD38low/-, C-kit-/low and, lin-. CD45 is also a common marker of HSCs, except platelets and red blood cells. HSCs can generate a variety of cell types, including erythrocytes, neutrophils, basophils, eosinophils, platelets, mast cells, monocytes, tissue macrophages, osteoclasts, and the T and B lymphocytes. The regulation of hematopoietic stem cells is a complex process involving self-renewal, survival and proliferation, lineage commitment and differentiation and is coordinated by diverse mechanisms including intrinsic cellular programming and external stimuli, such as adhesive interactions with the micro-environmental stroma and the actions of cytokines.

Different paracrine factors are important in causing hematopoietic stem cells to differentiate along particular pathways. Paracrine factors involved in blood cell and lymphocyte formation are called cytokines. Cytokines can be made by several cell types, but they are collected and concentrated by the extracellular matrix of the stromal (mesenchymal) cells at the sites of hematopoiesis. For example, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and the multilineage growth factor IL-3 both bind to the heparan sulfate glycosaminoglycan of the bone marrow stroma. The extracellular matrix then presents these factors to the stem cells in concentrations high enough to bind to their receptors.

Mesenchymal Stem Cells (MSCs)

Mesenchymal stem cells (MSCs) (also known as bone marrow stromal stem cells or skeletal stem cells) are non-blood adult stem cells found in a variety of tissues. They are characterized by their spindle-shape morphologically; by the expression of specific

markers on their cell surface; and by their ability, under appropriate conditions, to differentiates along a minimum of three lineages (osteogenic, chondrogenic, and adipogenic).

No single marker that definitely delineates MSCs in vivo has been identified due to the lack of consensus regarding the MSC phenotype, but it generally is considered that MSCs are positive for cell surface markers CD105, CD166, CD90, and CD44 and that MSCs are negative for typical hematopoietic antigens, such as CD45, CD34, and CD14. As for the differentiation potential of MSCs, studies have reported that populations of bone marrow-derived MSCs have the capacity to develop into terminally differentiated mesenchymal phenotypes both in vitro and in vivo, including bone, cartilage, tendon, muscle, adipose tissue, and hematopoietic-supporting stroma. Studies using transgenic and knockout mice and human musculoskeletal disorders have reported that MSC differentiate into multiple lineages during embryonic development and adult homeostasis.

Analyses of the in vitro differentiation of MSCs under appropriate conditions that recapitulate the in vivo process have led to the identification of various factors essential for stem cell commitment. Among them, secreted molecules and their receptors (e.g., transforming growth factor-β), extracellular matrix molecules (e.g., collagens and proteoglycans), the actin cytoskeleton, and intracellular transcription factors (e.g., Cbfa1/Runx2, PPARγ, Sox9, and MEF2) have been shown to play important roles in driving the commitment of multipotent MSCs into specific lineages, and maintaining their differentiated phenotypes.

For example, it has been shown that osteogenesis of MSCs, both in vitro and in vivo, involves multiple steps and the expression of various regulatory factors. During osteogenesis, multipotent MSCs undergo asymmetric division and generate osteoprecursors, which then progress to form osteoprogenitors, preosteoblasts, functional osteoblasts, and eventually osteocytes. This progression from one differentiation stage to the next is accompanied by the activation and subsequent inactivation of transcription factors, i.e., Cbfa1/Runx2, Msx2, Dlx5, Osx, and expression

of bone-related marker genes, (i.e., osteopontin, collagen type I, alkaline phosphatase, bone sialoprotein, and osteocalcin).

Members of the Wnt family also have been shown to impact MSC osteogenesis. Wnts are a family of secreted cysteine-rich glycoproteins that have been implicated in the regulation of stem cell maintenance, proliferation, and differentiation during embryonic development. Canonical Wnt signaling increases the stability of cytoplasmic β-catenin by receptor-mediated inactivation of GSK-3 kinase activity and promotes β-catenin translocation into the nucleus. The active β-catenin/TCF/LEF complex then regulates the transcription of genes involved in cell proliferation. In humans, mutations in the Wnt co-receptor LRP5 lead to defective bone formation. "Gain of function" mutation results in high bone mass, whereas "loss of function" causes an overall loss of bone mass and strength, indicating that Wnt signaling is positively involved in embryonic osteogenesis. Canonical Wnt signaling pathway also functions as a stem cell mitogen via stabilization of intracellular β-catenin and activation of the β-catenin/TCF/LEF transcription complex, resulting in activated expression of cell cycle regulatory genes, such as Myc, cyclin D1, and Msx1. When MSCs are exposed to Wnt3a, a prototypic canonical Wnt signal, under standard growth medium conditions, they show markedly increased cell proliferation and a decrease in apoptosis, consistent with the mitogenic role of Wnts in hematopoietic stem cells. However, exposure of MSCs to Wnt3a conditioned medium or overexpression of ectopic Wnt3a during osteogenic differentiation inhibits osteogenesis in vitro through β-catenin mediated down-regulation of TCF activity. The expression of several osteoblast specific genes, (e.g., alkaline phosphatase, bone sialoprotein, and osteocalcin), is dramatically reduced, while the expression of Cbfa1/Runx2, an early osteo-inductive transcription factor is not altered, implying that Wnt3a-mediated canonical signaling pathway is necessary, but not sufficient, to completely block MSC osteogenesis. On the other hand, Wnt5a, a typical non-canonical Wnt member, has been shown to promote osteogenesis in vitro. Since Wnt3a promotes MSC proliferation during early osteogenesis, it is thought likely that canonical Wnt signaling functions in the initiation of early osteogenic commitment by increasing the number of osteoprecursors in the stem

cell compartment, while non-canonical Wnt drives the progression of osteoprecursors to mature functional osteoblasts.

Epithelial stem cells.

An epithelial membrane is a continuous multicellular sheet composed of an epithelium adhered to underlying connective tissue. Epithelial membranes can be cutaneous (e.g. skin), mucous (e.g., gastrointestinal lining), and or serous (e.g. pleural lining, pericardial lining and peritoneal lining).

Epithelial stem cells line the gastrointestinal tract in deep crypts and give rise to absorptive cells, goblet cells, paneth cells, and enteroendocrine cells.

Components of the Human Gastrointestinal Tract

The gastrointestinal tract is a continuous tube that extends from the mouth to the anus. On a gross level, the gastrointestinal tract is composed of the following organs: the mouth, most of the pharynx, the esophagus, the stomach, the small intestine (duodenum, jejunum and ileum), and the large intestine. Each segment of the gastrointestinal tract participates in the absorptive processes essential to digestion by producing chemical substances that facilitate digestion of orally-taken foods, liquids, and other substances such as therapeutic agents.

Within the gastrointestinal tract, the small intestine, the site of most digestion and absorption, is structured specifically for these important functions. The small intestine is divided into three segments: the duodenum, the jejunum, and the ileum. The absorptive cells of the small intestine produce several digestive enzymes called the “brush-border” enzymes. Together with pancreatic and intestinal juices, these enzymes facilitate the absorption of substances from the chyme in the small intestine. The large intestine, the terminal portion of the gastrointestinal tract, contributes to the completion of absorption, the production of certain vitamins, and the formation and expulsion of feces.

At the cellular level, the epithelium is a purely cellular avascular tissue layer that covers all free surfaces (cutaneous, mucous, and serous) of the body including the

glands and other structures derived from it. It lines both the exterior of the body, as skin, and the interior cavities and lumen of the body. While the outermost layer of human skin is composed of dead stratified squamous, keratinized epithelial cells, mucous membranes lining the inside of the mouth, the esophagus, and parts of the rectum are themselves lined by nonkeratinized stratified squamous epithelium. Epithelial cell lines are present inside of the lungs, the gastrointestinal tract, and the reproductive and urinary tracts, and form the exocrine and endocrine glands.

Epithelial cells are involved in secretion, absorption, protection, transcellular transport, sensation detection and selective permeability. There are variations in the cellular structures and functions in the epithelium throughout the gastrointestinal tract. The epithelium in the mouth, pharynx, esophagus and anal canal is mainly a protective, nonkeratinized, squamous epithelium. The epithelium of the stomach is composed of (i) simple columnar cells that participate in nutrient and fluid absorption and secretion, (ii) mucus-producing goblet cells that participate in protective and mechanical functions, and (iii) enteroendocrine cells that participate in the secretion of gastrointestinal hormones. Additionally, within the intestine, the epithelial lining provides an important defense barrier against microbial pathogens.

The development of intestinal epithelium involves three major phases: 1) an early phase of epithelial proliferation and morphogenesis; 2) an intermediate period of cellular differentiation in which the distinctive cell type's characteristic of intestinal epithelium appear; and 3) a final phase of biochemical and functional maturation. Intestinal crypts, located at the base of villi, contain stem cells which supply the entire epithelial cell surface with a variety of epithelial cell subtypes. These specialized cells provide for an external environment-internal environment interface, ion and fluid secretion and reabsorption, antigen recognition, hormone secretion, and surface protection. The exposure of epithelial cells on the surfaces of the intestinal lumen subjects them to a wide range of assaults, including microbial, chemical, and physical forces; thus they also may contribute to patho-physiologic impairment in diseases. Additionally, these cells are targets for inflammation, infection, and malignant transformation.

Within the intestinal tract, the epithelium forms upon stem cell differentiation.

Molecular Markers of Gastrointestinal Epithelial Stem Cells

As disclosed in U.S. Published Application No. 2009/0269769, which is incorporated herein by reference in its entirety, there are no universally accepted molecular markers that identify gastrointestinal stem cells. However, several markers have been used to identify stem cells in small and large intestinal tissues. These include: β-1-integrin, mushashi-1, CD45, and cytokeratin.

CD45, also called the common leukocyte antigen, T220 and B220 in mice, is a transmembrane protein with cytoplasmic protein tyrosine phosphatase (PTP) activity. CD45 is found in hematopoietic cells except erythrocytes and platelets. CD45 has several isoforms that can be seen in the various stages of differentiation of normal hematopoietic cells.

Mushashi-1 is an early developmental antigenic marker of stem cells and glial/neuronal cell precursor cells.

β-1-integrin (CD29, fibronectin receptor), is a β-subunit of a heterodimer protein member of the integrin family of proteins; integrins are membrane receptors involved in cell adhesion and recognition.

Cytokeratins are intermediate filament proteins found in the intracytoplasmic cystoskeleton of the cells that comprise epithelial tissue.

There are four main epithelial cell lineages: (i) columnar epithelial cells, (ii) goblet cells, (iii) enteroendocrine chromaffin cells, and (iv) Paneth cells. Several molecular markers have been used to identify each of these lineages.

The markers used to identify columnar epithelial cells include: intestinal alkaline phosphatase (ALP1), sucrase isomaltase (SI), sodium/glucose cotransporter (SLGT1), dipeptidyl-peptidase 4 (DPP4), and CD26. Intestinal alkaline phosphatase (E.C. 3.1.3.1) is a membrane-bound enzyme localized in the brush border of enterocytes in the human intestinal epithelium. Sucrase-isomaltase (SI, EC 3.2.1.48) is an enterocyte-

specific small intestine brush-border membrane disaccharidase. Dipeptidyl-peptidase 4 (E.C. 3.4.14.5) is a membrane bound serine-type peptidase. Sodium/glucose transporter (SGLT) mediates transport of glucose into epithelial cells. SGLT belongs to the sodium/glucose cotransporter family SLCA5. Two different SGLT isoforms, SGLT1 and SGLT2, mediate renal tubular glucose reabsorption in humans. Both of them are characterized by their different substrate affinity. SGLT1 transports glucose as well as galactose, and is expressed both in the kidney and in the intestine. SGLT2 transports glucose and is believed to be responsible for 98% of glucose reabsorption; SGLT2 is generally found in the S1 and S2 segments of the proximal tubule of the nephron. CD26 is a multifunctional protein of 110 KDa strongly expressed on epithelial cells (kidney proximal tubules, intestine, and bile duct) and on several types of endothelial cells and fibroblasts and on leukocyte subsets.

The markers used to identify goblet cells include mucin 2 (MUC2) and trefoil factor 3 (TFF3). Mucin-2, a secreted gel-forming mucin, is the major gel-forming mucin secreted by goblet cells of the small and large intestines and is the main structural component of the mucus gel. Intestinal trefoil factor 3 is a nonmucin protein and a product of fully differentiated goblet cells.

The markers used to identify enteroendocrine chromaffin cells include chromogranin A (CHGA) and synaptophysin (SYP). Chromogranin A (CHGA) and its derived peptides, which are stored and released from dense-core secretory granules of neuroendocrine cells, have been implicated as playing multiple roles in the endocrine, cardiovascular, and nervous systems. Synaptophysin I (SYP) is a synaptic vesicle membrane protein that is ubiquitously expressed throughout the brain without a definite synaptic function.

The markers used to identify Paneth cells include lysozyme (LYZ), defensin (DEFA1), and matrix metallopeptidase 7 (MMP7). Lysozyme (LYZ or muramidase) (E.C. 3.2.1.17) catalyzes the hydrolysis of 1,4-beta-linkages between N-acetylmuramic acid and N-acetyl-D-glucosamine residues in a peptidoglycan and between N-acetyl-D-glucosamine residues in chitodextrins. Defensins (DEFA1) are small peptides that are

produced by leukocytes and epithelial cells. Human defensin α-1 is a 3.5-kDa, 30-amino-acid peptide that has shown effector functions in host innate immunity against some microorganisms. Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of metal-dependant enzymes that are responsible for the degradation of extracellular matrix components. MMPs are involved in various physiologic processes, such as embryogenesis and tissue remodeling and also play a role in invasion and metastasis of tumor cells, which require proteolysis of basal membranes and extracellular matrix.

Neural stem cells

The adult mammalian brain contains multipotent neural stem cells (NSCs) that have the capacity to self-renew and are responsible for neurogenesis and maintenance of specific regions of the adult brain. Neural stem cells can generate astrocytes, oligodendrocytes, and neurons. Self-renewal and differentiation of neural stem cells are directed by interactions within a complex network of intrinsic regulators and extrinsic factors. Recent proteomic analyses have identified a horde of transcription factors belonging to the Wnt/β-catenin, Notch and Sonic Hedgehog (shh) pathways, in addition to epigenetic modifications, microRNA networks and extrinsic growth factor networks, including but not limited to the FGFs and BMPs. (Yun *et al.*, 2010, J. Cell. Physiol. 225: 337-347).

With the advent of high throughput microarray and proteomic technologies, a number of different molecular signatures of neural stem cells have been identified, including but not limited to CD133/promini, nestin, NCAM, the HMG-box transcription factor, Sox2 and the bHLH protein, Olig2. (Holmberg et al., 2011, PLoS One., 6(3): e18454; Hombach-Klonisch et al., 2008, J. Mol. Med. 86(12): 1301-1314).

Skin stem cells.

Several different adult stem cell populations with distinct molecular signatures are responsible for maintaining skin homeostasis. These include, but are not limited to, epidermal stem cells of the interfollicular region, epidermal stem cells of the hair follicle (also known as the bulge stem cells), dermal stem cells, dermal papilla stem cells, and

sebaceous gland stems. The epidermal stem cells are ectodermal in origin while the dermal stem cells originate from the mesoderm and are mesenchymal in nature. (Zouboulis et al., 2008, Exp. Gerontol., 43: 986-997).

The interfollicular epidermal stem cells reside in the basal layer of the epidermis and give rise to keratinocytes, which migrate to the surface of the skin and form a protective layer. A diverse range of molecular signatures has been described for such epidermal stem cells including but not limited to high α6-integrin, low CD71, high Delta 1 (Notch signaling ligand) and high CD200 expression levels. The follicular stem cells located at the base of hair follicles give rise to both hair follicle and to the epidermis. These are characterized by Cytokeratin 15 (K15) immunostaining and high levels of β1-integrin. Dermal stem cell marker proteins include but are not limited to nestin, fibronectin and vimentin, the surface markers for dermal papilla stem cells include mesenchymal stem cell markers such as for example CD44, CD73 and CD90 and sebaceous stem cells express keratin 14. (Zouboulis et al., 2008, Exp. Gerontol., 43: 986-997).

In addition, adult somatic cells can be reprogrammed to enter an embryonic stem cell–like state by being forced to express a set of transcription factors, for example, Oct-3/4 (or Pou5f1, the Octamer transcription factor-3/4), the Sox family of transcription factors (e.g., Sox-1, Sox-2, Sox-3, and Sox-15), the Klf family transcription factors (Klf-1, Klf-2, Klf-4, and Klf-5), and the Myc family of transcription factors (e.g., c-Myc, N-Myc, and L-Myc). For example, human inducible Pluripotent Stem cells (iPSCs) are cells reprogrammed to express transcription factors that express stem cell markers and are capable of generating cells characteristic of all three germ layers (i.e., ectoderm, mesoderm, and endoderm).

1.3. Stem Cell Niches

Adult tissue compartments contain endogenous niches of adult stem cells that are capable of differentiating into diverse cell lineages of determined endodermal, mesodermal or ectodermal fate depending on their location in the body. For example, in the presence of an appropriate set of internal and external signals, bone marrow-

derived adult hematopoietic stem cells (HSCs) have the potential to differentiate into blood, endothelial, hepatic and muscle cells; brain-derived neural stem cells (NSCs) have the potential to differentiate into neurons, astrocytes, oligodendrocytes and blood cells; gut- and epidermis-derived adult epithelial stem cells (EpSCs) have the potential to give rise to cells of the epithelial crypts and epidermal layers; adipose-derived stem cells (ASCs) have the potential to give rise to fat, muscle, cartilage, endothelial cells, neuron-like cells and osteoblasts; and bone-marrow-derived adult mesenchymal stem cells (MSCs) have the potential to give rise to bone, cartilage, tendon, adipose, muscle, marrow stroma and neural cells.

Endogenous adult stem cells are embedded within the ECM component of a given tissue compartment, which, along with support cells, form the cellular niche. Such cellular niches within the ECM scaffold together with the surrounding microenvironment contribute important biochemical and physical signals, including growth factors and transcription factors required to initiate stem cell differentiation into committed precursors cells and subsequent precursor cell maturation to form adult tissue cells with specialized phenotypic and functional characteristics.

Stem cell markers

Coating the surface of every cell in the body are specialized proteins ("receptors") capable of selectively binding or adhering to other "signaling" molecules. Normally, cells use these receptors and the molecules that bind to them as a way of communicating with other cells and to carry out their proper functions in the body. These cell surface receptors are the stem cell markers. Each cell type has a certain combination of receptors on their surface that makes them distinguishable from other kinds of cells.

The cluster of differentiation (CD) system is a protocol used for the identification of cell surface molecules. CD molecules can act in numerous ways, often acting as receptors or ligands; by which a signal cascade is initiated, altering the behavior of the cell. Some CD proteins do not play a role in cell signaling, but have other functions, such as cell adhesion. Generally, a proposed surface molecule is assigned a CD

number once two specific monoclonal antibodies (mAb) are shown to bind to the molecule. If the molecule has not been well-characterized, or has only one mAb, the molecule usually is given the provisional indicator "w."

The CD system nomenclature commonly used to identify cell markers thus allows cells to be defined based on what molecules are present on their surface. These markers often are used to associate cells with certain functions. While using one CD molecule to define populations is uncommon, combining markers has allowed for cell types with very specific definitions. More than 350 CD molecules have been identified for humans.

CD molecules are utilized in cell sorting using various methods, including flow cytometry. Cell populations usually are defined using a "+" or a "-" symbol to indicate whether a certain cell fraction expresses or lacks a particular CD molecule.

Table 2 identifies markers commonly used to identify stem cells and to characterize differentiated cell types:

Table 2. Commonly-Used Stem Cell Surface Markers and Corresponding Differentiated Cell Types

Marker Name	Cell Type	Significance
Blood Vessel		
Fetal liver kinase-1 (Flk1)	Endothelial	Cell-surface receptor protein that identifies endothelial cell progenitor; marker of cell-cell contacts
Smooth muscle cell-specific myosin heavy chain	Smooth muscle	Identifies smooth muscle cells in the wall of blood vessels
Vascular endothelial cell cadherin	Smooth muscle	Identifies smooth muscle cells in the wall of blood vessels

Bone		
Bone-specific alkaline phosphatase (BAP)	Osteoblast	Enzyme expressed in osteoblast; activity indicates bone formation
Hydroxyapatite	Osteoblast	Mineralized bone matrix that provides structural integrity; marker of bone formation
Osteocalcin (OC)	Osteoblast	Mineral-binding protein synthesized by osteoblast; marker of bone formation
Bone Marrow and Blood		
Bone morphogenetic protein receptor (BMPR)	Mesenchymal stem and progenitor cells	Important for the differentiation of committed mesenchymal cell types from mesenchymal stem and progenitor cells; BMPR identifies early mesenchymal lineages (stem and progenitor cells)
CD4 and CD8	White blood cell (WBC)	Cell-surface protein markers specific for mature T lymphocyte (WBC subtype)
CD34	Hematopoietic stem cell (HSC), satellite, endothelial progenitor	Cell-surface protein on bone marrow cell, indicative of a HSC and endothelial progenitor; CD34 also identifies muscle satellite, a muscle stem cell
$CD34^{+}Sca1^{+}$ Lin^{-} profile	Mesenchymal stem cell (MSC)	Identifies MSCs, which can differentiate into adipocyte, osteocyte, chondrocyte, and myocyte
CD38	Absent on HSC Present on WBC lineages	Cell-surface molecule that identifies WBC lineages. Selection of $CD34^{+}/CD38^{-}$ cells allows for purification of HSC populations
CD44	Mesenchymal	A type of cell-adhesion molecule used to identify specific types of mesenchymal cells
c-Kit	HSC, MSC	Cell-surface receptor on BM cell types that identifies HSC and MSC; binding by fetal calf serum (FCS) enhances proliferation of ES cells, HSCs, MSCs, and hematopoietic progenitor cells
Colony-forming unit (CFU)	HSC, MSC progenitor	CFU assay detects the ability of a single stem cell or progenitor cell to give rise to one or more cell lineages, such as red blood cell (RBC) and/or white blood cell (WBC) lineages

Bone Marrow and Blood		
Fibroblast colony-forming unit (CFU-F)	Bone marrow fibroblast	An individual bone marrow cell that has given rise to a colony of multipotent fibroblastic cells; such identified cells are precursors of differentiated mesenchymal lineages
Hoechst dye	Absent on HSC	Fluorescent dye that binds DNA; HSC extrudes the dye and stains lightly compared with other cell types
Leukocyte common antigen (CD45)	WBC	Cell-surface protein on WBC progenitor
Lineage surface antigen (Lin)	HSC, MSC Differentiated RBC and WBC lineages	Thirteen to 14 different cell-surface proteins that are markers of mature blood cell lineages; detection of Lin-negative cells assists in the purification of HSC and hematopoietic progenitor populations
Mac-1	WBC	Cell-surface protein specific for mature granulocyte and macrophage (WBC subtypes)
Muc-18 (CD146)	Bone marrow fibroblasts, endothelial	Cell-surface protein (immunoglobulin superfamily) found on bone marrow fibroblasts, which may be important in hematopoiesis; a subpopulation of Muc-18+ cells are mesenchymal precursors
Stem cell antigen (Sca-1)	HSC, MSC	Cell-surface protein on bone marrow (BM) cell, indicative of HSC and MSC Bone Marrow and Blood cont.
Stro-1 antigen	Stromal (mesenchymal) precursor cells, hematopoietic cells	Cell-surface glycoprotein on subsets of bone marrow stromal (mesenchymal) cells; selection of Stro-1+ cells assists in isolating mesenchymal precursor cells, which are multipotent cells that give rise to adipocytes, osteocytes, smooth myocytes, fibroblasts, chondrocytes, and blood cells
Thy-1	HSC, MSC	Cell-surface protein; negative or low detection is suggestive of HSC
Cartilage		
Collagen types II and IV	Chondrocyte	Structural proteins produced specifically by chondrocyte
Keratin	Keratinocyte	Principal protein of skin; identifies differentiated keratinocyte
Sulfated	Chondrocyte	Molecule found in connective tissues; synthesized by

proteoglycan		chondrocyte
Fat		
Adipocyte lipid-binding protein (ALBP)	Adipocyte	Lipid-binding protein located specifically in adipocyte
Fatty acid transporter (FAT)	Adipocyte	Transport molecule located specifically in adipocyte
Adipocyte lipid-binding protein (ALBP)	Adipocyte	Lipid-binding protein located specifically in adipocyte
Perilipin A	Adipocyte	Protein associated with mature adipocytes
Liver		
Albumin	Hepatocyte	Principal protein produced by the liver; indicates functioning of maturing and fully differentiated hepatocytes
B-1 integrin	Hepatocyte	Cell-adhesion molecule important in cell-cell interactions; marker expressed during development of liver
Nervous System		
CD133	Neural stem cell, HSC	Cell-surface protein that identifies neural stem cells, which give rise to neurons and glial cells
Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	Astrocyte	Protein specifically produced by astrocyte
Microtubule-associated protein-2 (MAP-2)	Neuron	Dendrite-specific MAP; protein found specifically in dendritic branching of neuron
Myelin basic protein (MPB)	Oligodendrocyte	Protein produced by mature oligodendrocytes; located in the myelin sheath surrounding neuronal structures
Nestin	Neural progenitor	Intermediate filament structural protein expressed in primitive neural tissue
Neural tubulin	Neuron	Important structural protein for neuron; identifies differentiated neuron
Neurofilament	Neuron	Important structural protein for neuron; identifies

(NF)		differentiated neuron
Nervous System		
Neurosphere	Embryoid body (EB), ES	Cluster of primitive neural cells in culture of differentiating ES cells; indicates presence of early neurons and glia
Noggin	Neuron	A neuron-specific gene expressed during the development of neurons
O4	Oligodendrocyte	Cell-surface marker on immature, developing oligodendrocyte
O1	Oligodendrocyte	Cell-surface marker that characterizes mature oligodendrocyte
Synaptophysin	Neuron	Neuronal protein located in synapses; indicates connections between neurons
Tau	Neuron	Type of MAP; helps maintain structure of the axon
Pancreas		
Cytokeratin 19 (CK19)	Pancreatic epithelium	CK19 identifies specific pancreatic epithelial cells that are progenitors for islet cells and ductal cells
Glucagon	Pancreatic islet	Expressed by alpha-islet cell of pancreas
Insulin	Pancreatic islet	Expressed by beta-islet cell of pancreas
Insulin-promoting factor-1 (PDX-1)	Pancreatic islet	Transcription factor expressed by beta-islet cell of pancreas
Nestin	Pancreatic progenitor	Structural filament protein indicative of progenitor cell lines including pancreatic
Pancreatic polypeptide	Pancreatic islet	Expressed by gamma-islet cell of pancreas
Somatostatin	Pancreatic islet	Expressed by delta-islet cell of pancreas

Pluripotent Stem Cells		
Alkaline phosphatase	Embryonic stem (ES), embryonal carcinoma (EC)	Elevated expression of this enzyme is associated with undifferentiated pluripotent stem cell (PSC)
Alpha-fetoprotein (AFP)	Endoderm	Protein expressed during development of primitive endoderm; reflects endodermal differentiation Pluripotent Stem Cells
Bone morphogenetic protein-4	Mesoderm	Growth and differentiation factor expressed during early mesoderm formation and differentiation
Brachyury	Mesoderm	Transcription factor important in the earliest phases of mesoderm formation and differentiation; used as the earliest indicator of mesoderm formation
Cluster designation 30 (CD30)	ES, EC	Surface receptor molecule found specifically on PSC
Cripto (TDGF-1)	ES, cardiomyocyte	Gene for growth factor expressed by ES cells, primitive ectoderm, and developing cardiomyocyte
GATA-4 gene	Endoderm	Expression increases as ES differentiates into endoderm
GCTM-2	ES, EC	Antibody to a specific extracellular-matrix molecule that is synthesized by undifferentiated PSCs
Genesis	ES, EC	Transcription factor uniquely expressed by ES cells either in or during the undifferentiated state of PSCs
Germ cell nuclear factor	ES, EC	Transcription factor expressed by PSCs
Hepatocyte nuclear factor-4 (HNF-4)	Endoderm	Transcription factor expressed early in endoderm formation
Nestin	Ectoderm, neural and pancreatic progenitor	Intermediate filaments within cells; characteristic of primitive neuroectoderm formation
Neuronal cell-adhesion molecule (N-CAM)	Ectoderm	Cell-surface molecule that promotes cell-cell interaction; indicates primitive neuroectoderm formation

Pluripotent Stem Cells		
OCT4/POU5F1	ES, EC	Transcription factor unique to PSCs; essential for establishment and maintenance of undifferentiated PSCs
Pax6	Ectoderm	Transcription factor expressed as ES cell differentiates into neuroepithelium
Stage-specific embryonic antigen-3 (SSEA-3)	ES, EC	Glycoprotein specifically expressed in early embryonic development and by undifferentiated PSCs
Stage-specific embryonic antigen-4 (SSEA-4)	ES, EC	Glycoprotein specifically expressed in early embryonic development and by undifferentiated PSCs
Stem cell factor (SCF or c-Kit ligand)	ES, EC, HSC, MSC	Membrane protein that enhances proliferation of ES and EC cells, hematopoietic stem cell (HSCs), and mesenchymal stem cells (MSCs); binds the receptor c-Kit
Telomerase	ES, EC	An enzyme uniquely associated with immortal cell lines; useful for identifying undifferentiated PSCs
TRA-1-60	ES, EC	Antibody to a specific extracellular matrix molecule is synthesized by undifferentiated PSCs
TRA-1-81	ES, EC	Antibody to a specific extracellular matrix molecule normally synthesized by undifferentiated PSCs
Vimentin	Ectoderm, neural and pancreatic progenitor	Intermediate filaments within cells; characteristic of primitive neuroectoderm formation
Skeletal Muscle/Cardiac/Smooth Muscle		
MyoD and Pax7	Myoblast, myocyte	Transcription factors that direct differentiation of myoblasts into mature myocytes
Myogenin and MR4	Skeletal myocyte	Secondary transcription factors required for differentiation of myoblasts from muscle stem cells
Myosin heavy chain	Cardiomyocyte	A component of structural and contractile protein found in cardiomyocyte
Myosin light chain	Skeletal myocyte	A component of structural and contractile protein found in skeletal myocyte

Table 3 shows commonly used markers employed by skilled artisans to identify and characterize differentiated white blood cell types:

Table 3. List of Surface Markers on White Blood Cell Types

Type of Cell	CD Markers
Stem cells	CD34+,CD31-
All leukocyte groups	CD45+
Granulocyte	CD45+,CD15+
Monocyte	CD45+,CD14+
T lymphocyte	CD45+,CD3+
T helper cell	CD45+,CD3+,CD4+
Cytotoxic T cell	CD45+,CD3+,CD8+
B lymphocyte	CD45+,CD19+ or CD45+,CD20+
Thrombocyte	CD45+,CD61+
Natural killer cell	CD16+,CD56+,CD3-

Table 4 correlates the exemplary protein expression profile of adipose derived stem cells (ASCs) with the corresponding surface markers (Flynn *et. al.*, 2208 Organogenesis, 4(4): 228-235; Gronthos *et. al.*, 2011, J. Cell. Physiol., 189: 54-63).

Table 4. Adipose-derived Stem Cell Protein Expression and Surface Marker Profile

Class	Protein	Marker
Cell Adhesion	Integrin β_1	CD29
	Integrin α_4	$CD49_d$
	Integrin a_a	$CD49_e$
	Vascular Cell Adhesion Molecule	VCAM; CD106
	Intracellular Adhesion Molecule -1	ICAM; CD54
	Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule	ALCAM; CD166
	Tetraspan	CD9
	Endoglin	CD105
	Muc18	CD146
Receptors	Hyaluronate receptor	CD44
	Transferrin receptor	CD71
	Insulin receptor	
	Glucocorticoid receptor	
	Triiodothyronine (T3) receptor	
	Retinoic acid receptor	

Class	Protein	Marker
ECM	Collagen type I	
	Collagen type III	
	Collagen type IV	
	Collagen type VI	CD68
	Osteopontin	
	Osteonectin	
	Laminin	
	Elastin	
	Fibronectin	
	Heparan sulfate proteoglycan	
Cytoskeletal	A-smooth muscle actin	
	Vimentin	
Other	HLA-ABC	Major histocompatibility complex class I antigen
	DAF	CD55
	Complement protectin	CD59

CD3 (TCR complex) is a protein complex composed of four distinct chains. In mammals, the complex contains a CD3γ chain, a CD3δ chain, and two CD3ε chains, which associate with the T cell receptor (TCR) and the ζ-chain to generate an activation signal in T lymphocytes. Together, the TCR, the ζ-chain and CD3 molecules comprise the TCR complex. The intracellular tails of CD3 molecules contain a conserved motif known as the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM), which is essential for the signaling capacity of the TCR. Upon phosphorylation of the ITAM, the CD3 chain can bind ZAP70 (zeta associated protein), a kinase involved in the signaling cascade of the T cell.

Integrins are receptors that mediate attachment between a cell and the tissues surrounding it and are involved in cell-cell and cell-matrix interactions. In mammals, 18 α and 8 β subunits have been characterized. Both α and β subunits contain two separate tails, both of which penetrate the plasma membrane and possess small cytoplasmic domains.

Integrin αM (ITGAM; CD11b; macrophage-1 antigen (Mac-1); complement receptor 3 (CR3)) is a protein subunit of the heterodimeric integrin αMβ2 molecule. The second chain of αMβ2 is the common integrin β2 subunit (CD18). αMβ2 is expressed on the surface of many leukocytes including monocytes, granulocytes, macrophages and natural killer cells. It generally is believed that αMβ2 mediates inflammation by regulating leukocyte adhesion and migration. Further, αMβ2 is thought to have a role in phagocytosis, cell-mediated cytotoxicity, chemotaxis and cellular activation, as well as being involved in the complement system due to its capacity to bind inactivated complement component 3b (iC3b). The ITGAM subunit of integrin αMβ2 is involved directly in causing the adhesion and spreading of cells, but cannot mediate cellular migration without the presence of the β2 (CD18) subunit.

CD14 is a cell surface protein expressed mainly by macrophages and, to a lesser extent, neutrophil granulocytes. CD14+ cells are monocytes that can differentiate into a host of different cells; for example, differentiation to dendritic cells is promoted by cytokines such as GM-CSF and IL-4. CD14 acts as a co-receptor (along with toll-like receptor (TLR) 4 and lymphocyte antigen 96 (MD-2)) for the detection of bacterial lipopolysaccharide (LPS). CD14 only can bind LPS in the presence of lipopolysaccharide binding protein (LBP).

CD15 (3-fucosyl-N-acetyl-lactosamine; stage specific embryonic antigen 1 (SSEA-1)) is a carbohydrate adhesion molecule that can be expressed on glycoproteins, glycolipids and proteoglycans. CD15 commonly is found on neutrophils and mediates phagocytosis and chemotaxis.

CD16 is an Fc receptor (FcγRIIIa and FcγRIIIb) found on the surface of natural killer cells, neutrophil polymorphonuclear leukocytes, monocytes and macrophages. Fc receptors bind to the Fc portion of IgG antibodies.

CD19 is a human protein expressed on follicular dendritic cells and B cells. This cell surface molecule assembles with the antigen receptor of B lymphocytes in order to decrease the threshold for antigen receptor-dependent stimulation. It generally is believed that, upon activation, the cytoplasmic tail of CD19 becomes phosphorylated,

which allows binding by Src-family kinases and recruitment of phosphoinositide 3 (PI-3) kinases.

CD20 is a non-glycosylated phosphoprotein expressed on the surface of all mature B-cells. Studies suggest that CD20 plays a role in the development and differentiation of B-cells into plasma cells. CD20 is encoded by a member of the membrane-spanning 4A gene family (MS4A). Members of this protein family are characterized by common structural features and display unique expression patterns among hematopoietic cells and nonlymphoid tissues.

CD31 (platelet/endothelial cell adhesion molecule; PECAM1) normally is found on endothelial cells, platelets, macrophages and Kupffer cells, granulocytes, T cells, natural killer cells, lymphocytes, megakaryocytes, osteoclasts and neutrophils. CD31 has a key role in tissue regeneration and in safely removing neutrophils from the body. Upon contact, the CD31 molecules of macrophages and neutrophils are used to communicate the health status of the neutrophil to the macrophage.

CD34 is a monomeric cell surface glycoprotein normally found on hematopoietic cells, endothelial progenitor cells, endothelial cells of blood vessels, and mast cells. The CD34 protein is a member of a family of single-pass transmembrane sialomucin proteins and functions as a cell-cell adhesion factor. Studies suggest that CD34 also may mediate the attachment of stem cells to bone marrow extracellular matrix or directly to stromal cells.

CD44 (the "hyaluronan receptor"), a cell-surface glycoprotein involved in cell-cell interactions, cell adhesion and migration, is used to identify specific types of mesenchymal cells.

CD45 (protein tyrosine phosphatase, receptor type, C; PTPRC) cell surface molecule is expressed specifically in hematopoietic cells. CD45 is a protein tyrosine phosphatase (PTP) with an extracellular domain, a single transmembrane segment, and two tandem intracytoplasmic catalytic domains, and thus belongs to receptor type PTP. Studies suggest it is an essential regulator of T-cell and B-cell antigen receptor

signaling that functions by direct interaction with components of the antigen receptor complexes, or by activating various Src family kinases required for antigen receptor signaling. CD45 also suppresses JAK kinases, and thus functions as a regulator of cytokine receptor signaling. The CD45 family consists of multiple members that are all products of a single complex gene. Various known isoforms of CD45 include: CD45RA, CD45RB, CD45RC, CD45RAB, CD45RAC, CD45RBC, CD45RO, and CD45R (ABC). Different isoforms may be found on different cells. For example, CD45RA is found on naïve T cells and CD45RO is found on memory T cells.

CD56 (neural cell adhesion molecule, NCAM) is a homophilic binding glycoprotein expressed on the surface of neurons, glia, skeletal muscle and natural killer cells. It generally is believed that NCAM has a role in cell-cell adhesion, neurite outgrowth, and synaptic plasticity. There are three known main isoforms of NCAM, each varying only in their cytoplasmic domains: NCAM-120kDA (glycosylphopharidylinositol (GPI) anchored); NCAM-140kDa (short cytoplasmic domain); and NCAM (long cytoplasmic domain). The different domains of NCAM have different roles, with the Ig domains being involved in homophilic binding to NCAM, and the fibronectin type III (FNIII) domains being involved in signaling leading to neurite outgrowth.

CD59 refers to a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked membrane glycoprotein which protects human cells from complement-mediated lysis.

The CD66 antigen family identifies a neutrophil-specific epitope within the hematopoietic system that is expressed by members of the carcinoembryonic antigen family of adhesion molecules, which belong within the immunoglobulin gene superfamily. The extracellular portions of all CD66 (a-f) molecules possess a N-terminal V-set IgSF domain which, lacks the canonical inter-b -sheet disulfide of the CD-2 family. CD66a is heavily glycosylated type 1 glycoprotein with more than 60% of the mass contributed by N-linked glycans, which bear sialylated Lex (sLe x, CD15s) structures. In CD66a they are spaced further apart, VxYxxLx21IxYxxV, and resemble motifs which bind tyrosine phosphatases such as SHIP-1 and-2. Activation of neutrophils leads to

phosphorylation of tyrosine residues in the CD66a cytoplasmic domain. CD66a is expressed on granulocytes and epithelial cells. Products of 4 of the 7 functional carcinoembryonic antigen (CEA) family genes, CD66a-d, are known to be expressed on hematopoietic cells. The expression of these molecules on hematopoietic cells is generally restricted to the myeloid lineage. These molecules are present at low levels on resting mature granulocytes but expression increases rapidly following activation with inflammatory agonists, probably as a result of exocytosis from storage granules. CD66a is detected on some macrophages in tissue sections and has been reported on T cells and a subpopulation of activated NK cells.

CD66b ((CGM1); CD67, CGM6, NCA-95) is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked protein that is a member of the immunoglobulin superfamily and carcinoembryonic antigen (CEA)-like subfamily. CD66b, expressed on granulocytes, generally is believed to be involved in regulating adhesion and activation of human eosinophils.

CD90 or Thy-1 is a 25–37 kDa heavily N-glycosylated, glycophosphatidylinositol (GPI) anchored conserved cell surface protein with a single V-like immunoglobulin domain, originally discovered as a thymocyte antigen. It belongs to the immunoglobulin gene superfamily. The complex carbohydrate side chains vary in composition between tissues and species. Generally, CD90 is expressed on hematopoietic stem cells and neurons. CD90 is highly expressed in connective tissue, on various fibroblast and stromal cell lines and is expressed on all thymocytes and peripheral T cells in mice. In humans, CD90 is expressed only on a small number of fetal thymocytes, 10%-40% of blood CD34+ cells in bone marrow, and <1% of CD3+CD4+ lymphocytes in peripheral circulation. CD90 also is expressed in the human lymph node HEV endothelium but not on other endothelia and lastly, is expressed on a limited number of lymphoblastoid and leukemic cell lines.

CD105 (endoglin) is a homodimeric integral membrane glycoprotein composed of disulfide-linked subunits of 90–95 kDa. In humans, it is expressed at high levels on vascular endothelial cells and on syncytiotrophoblast of term placenta. During human

heart development, it is expressed at high levels on endocardial cushion tissue mesenchyme during heart septation and valve formation; subsequently expression drops as the valves mature. It also is expressed by a population of pre-erythroblasts, leukemic cells of lymphoid and myeloid lineages, and bone marrow stromal fibroblasts. Endoglin is an accessory protein of multiple kinase receptor complexes of the TGF-β superfamily. The TGF-β1 superfamily of structurally related peptides includes the TGF-β isoforms, β1, β2, β3, and β5, the activins and the bone morphogenetic proteins (BMPs). TGF-β-like factors are a multifunctional set of conserved growth and differentiation factors that control biological processes such as embryogenesis, organogenesis, morphogenesis of tissues like bone and cartilage, vasculogenesis, wound repair and angiogenesis, hematopoiesis, and immune regulation. Signaling by ligands of the TGF-β superfamily is mediated by a high affinity, ligand-induced, heteromeric complex consisting of related Ser/Thr kinase receptors divided into two subfamilies, type I and type II. The type II receptor transphosphorylates and activates the type I receptor in a Gly/Ser-rich region. The type I receptor in turn phosphorylates and transduces signals to a novel family of recently identified downstream targets, termed Smads. Endoglin binds transforming growth factor (TGF) TGF-β1 and -β3 by associating with the TGF-β type II receptor, interacts with activin-A, interacts with bone morphogenic protein (BMP)-7 via activin type II receptors, ActRII and ActRIIB, and binds BMP-2 by interacting with the ligand binding type I receptors ALK3 and ALK6.

CD166 antigen (ALCAM), a 556 amino acid glycoprotein belonging to the immunoglobulin gene superfamily, is encoded by the activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM) gene in humans. It contains a secretory signal sequence, an extracellular domain which contains 3 Ig-like C2-type domains, 2 Ig-like V-type domains and 9 potential N-linked glycosylation sites, a hydrophobic transmembrane spanning domain and a 32 amino acid cytoplasmic domain with no known motifs. The N-terminal Ig domain is the binding site for both homophilic and CD166-CD6 interactions. CD166 is anchored to the actin cytoskeleton via the cytoplasmic domain but the receptors involved in this interaction are unknown. The soluble CD166 is produced by proteolytic cleavage of extracellular domains or by alternative splicing. It is expressed on mesenchymal stem cells and progenitor cells and on cortical thymic epithelial cells and

medullary thymic epithelial cells, neurons, activated T cells, B cells, monocytes, fibroblasts, endothelium, epithelium, primitive subsets of hematopoietic cells including pluripotent stem cells, blastocysts and endometrium.

1.4. Growth Factors

Growth factors are extracellular polypeptide molecules that bind to a cell-surface receptor triggering an intracellular signaling pathway, leading to proliferation, differentiation, or other cellular response. These pathways stimulate the accumulation of proteins and other macromolecules, and they do so by both increasing their rate of synthesis and decreasing their rate of degradation. One intracellular signaling pathway activated by growth factor receptors involves the enzyme PI 3-kinase, which adds a phosphate from ATP to the 3 position of inositol phospholipids in the plasma membrane. The activation of PI 3-kinase leads to the activation of several protein kinases, including S6 kinase. The S6 kinase phosphorylates ribosomal protein S6, increasing the ability of ribosomes to translate a subset of mRNAs, most of which encode ribosomal components, as a result of which, protein synthesis increases. When the gene encoding S6 kinase is inactivated in *Drosophila*, cell numbers are normal, but cell size is abnormally small, and the mutant flies are small. Growth factors also activate a translation initiation factor called eIF4E, further increasing protein synthesis and cell growth.

Growth factor stimulation also leads to increased production of the gene regulatory protein Myc, which plays a part in signaling by mitogens. Myc increases the transcription of a number of genes that encode proteins involved in cell metabolism and macromolecular synthesis. In this way, it stimulates both cell metabolism and cell growth.

Some extracellular signal proteins, including platelet-derived growth factor (PDGF), can act as both growth factors and mitogens, stimulating both cell growth and cell-cycle progression. This functional overlap is achieved in part by overlaps in the intracellular signaling pathways that control these two processes. The signaling protein Ras, for example, is activated by both growth factors and mitogens. It can stimulate the

PI3-kinase pathway to promote cell growth and the MAP-kinase pathway to trigger cell-cycle progression. Similarly, Myc stimulates both cell growth and cell-cycle progression. Extracellular factors that act as both growth factors and mitogens help ensure that cells maintain their appropriate size as they proliferate.

Since many mitogens, growth factors, and survival factors are positive regulators of cell-cycle progression, cell growth, and cell survival, they tend to increase the size of organs and organisms. In some tissues, however, cell and tissue size also is influenced by inhibitory extracellular signal proteins that oppose the positive regulators and thereby inhibit organ growth. The best-understood inhibitory signal proteins are TGF-β and its relatives. TGF-β inhibits the proliferation of several cell types, either by blocking cell-cycle progression in G1 or by stimulating apoptosis. TGF-β binds to cell-surface receptors and initiates an intracellular signaling pathway that leads to changes in the activities of gene regulatory proteins called Smads. This results in complex changes in the transcription of genes encoding regulators of cell division and cell death.

Bone morphogenetic protein (BMP), a TGF-β family member, helps trigger the apoptosis that removes the tissue between the developing digits in the mouse paw. Like TGF-β, BMP stimulates changes in the transcription of genes that regulate cell death.

Fibroblast Growth Factor (FGF)

The fibroblast growth factor (FGF) family currently has over a dozen structurally related members. FGF1 is also known as acidic FGF; FGF2 is sometimes called basic FGF (bFGF); and FGF7 sometimes goes by the name keratinocyte growth factor. Over a dozen distinct FGF genes are known in vertebrates; they can generate hundreds of protein isoforms by varying their RNA splicing or initiation codons in different tissues. FGFs can activate a set of receptor tyrosine kinases called the fibroblast growth factor receptors (FGFRs). Receptor tyrosine kinases are proteins that extend through the cell membrane. The portion of the protein that binds the paracrine factor is on the extracellular side, while a dormant tyrosine kinase (i.e., a protein that can phosphorylate another protein by splitting ATP) is on the intracellular side. When the FGF receptor

binds an FGF (and only when it binds an FGF), the dormant kinase is activated, and phosphorylates certain proteins within the responding cell, activating those proteins.

FGFs are associated with several developmental functions, including angiogenesis (blood vessel formation), mesoderm formation, and axon extension. While FGFs often can substitute for one another, their expression patterns give them separate functions. FGF2 is especially important in angiogenesis, whereas FGF8 is involved in the development of the midbrain and limbs.

The expression levels of angiogenic factors, such as VEGF, IGF, PDGF, HGF, FGF, TGFm Angiopoeitin-1, and stem cell factor (SCF) have been found to differ amongst bone-derived-, cartilage-derived-, and adipose-derived MSCs. (Peng et al., 2008, Stems Cells and Development, 17: 761-774).

Insulin-like Growth Factor (IGF-1)

IGF-1, a hormone similar in molecular structure to insulin, has growth-promoting effects on almost every cell in the body, especially skeletal muscle, cartilage, bone, liver, kidney, nerves, skin, hematopoietic cell, and lungs. It plays an important role in childhood growth and continues to have anabolic effects in adults. IGF-1 is produced primarily by the liver as an endocrine hormone as well as in target tissues in a paracrine/autocrine fashion. Production is stimulated by growth hormone (GH) and can be retarded by undernutrition, growth hormone insensitivity, lack of growth hormone receptors, or failures of the downstream signaling molecules, including SHP2 and STAT5B. Its primary action is mediated by binding to its specific receptor, the Insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R), present on many cell types in many tissues. Binding to the IGF1R, a receptor tyrosine kinase, initiates intracellular signaling; IGF-1 is one of the most potent natural activators of the AKT signaling pathway, a stimulator of cell growth and proliferation, and a potent inhibitor of programmed cell death. IGF-1 is a primary mediator of the effects of growth hormone (GH). Growth hormone is made in the pituitary gland, released into the blood stream, and then stimulates the liver to produce IGF-1. IGF-1 then stimulates systemic body growth. In addition to its insulin-

like effects, IGF-1 also can regulate cell growth and development, especially in nerve cells, as well as cellular DNA synthesis.

Transforming Growth Factor beta (TGF-β)

There are over 30 structurally related members of the TGF-β superfamily, and they regulate some of the most important interactions in development. The proteins encoded by TGF-β superfamily genes are processed such that the carboxy-terminal region contains the mature peptide. These peptides are dimerized into homodimers (with themselves) or heterodimers (with other TGF-β peptides) and are secreted from the cell. The TGF-β superfamily includes the TGF-β family, the activin family, the bone morphogenetic proteins (BMPs), the Vg-1 family, and other proteins, including glial-derived neurotrophic factor (GDNF, necessary for kidney and enteric neuron differentiation) and Müllerian inhibitory factor, which is involved in mammalian sex determination. TGF-β family members TGF-β1, 2, 3, and 5 are important in regulating the formation of the extracellular matrix between cells and for regulating cell division (both positively and negatively). TGF-β1 increases the amount of extracellular matrix epithelial cells make both by stimulating collagen and fibronectin synthesis and by inhibiting matrix degradation. TGF-βs may be critical in controlling where and when epithelia can branch to form the ducts of kidneys, lungs, and salivary glands.

The members of the BMP family were originally discovered by their ability to induce bone formation. Bone formation, however, is only one of their many functions, and they have been found to regulate cell division, apoptosis (programmed cell death), cell migration, and differentiation. BMPs can be distinguished from other members of the TGF-β superfamily by their having seven, rather than nine, conserved cysteines in the mature polypeptide. The BMPs include proteins such as Nodal (responsible for left-right axis formation) and BMP4 (important in neural tube polarity, eye development, and cell death).

Neural Epidermal Growth-Factor-Like 1 (NELL1)

Neural epidermal growth-factor-like 1 (NEL-like 1, NELL1) is a gene that encodes an 810-amino acid polypeptide, which trimerizes to form a mature protein involved in the

regulation of cell growth and differentiation. The neural epidermal growth-factor-like (nel) gene first was detected in neural tissue from an embryonic chicken cDNA library, and its human orthologue NELL1 was discovered later in B-cells. Studies have reported the presence of NELL in various fetal and adult organs, including, but not limited to, the brain, kidneys, colon, thymus, lung, and small intestine.

NELL1- General Structure

Generally, the arrangement of the functional domains of the 810 amino acid NELL1 protein bears resemblance to thrombospondin-1 ("THBS1") and consists of a thrombospondin N-terminal domain ("TSPN") and several von Willebrand factor, type C ("VWC"), and epidermal growth-factor ("EGF") domains.

Additional studies have shown that there are two transcript variants encoding different isoforms. The nel-like 1 isoform 1 precursor transcript variant represents the longer transcript and encodes the longer isoform 1.

The conserved domains of the nel-like 1 isoform 1 precursor transcript reside in seven regions of the isoform 1 peptide and include: (1) a TSPN domain/Laminin G superfamily domain; (2) a VWC domain; (3) an EGF-like domain; (4) an EGF-like domain; (5) an EGF-like domain; (6) an EGF-like domain and (7) a VWC domain.

The first conserved domain region comprises amino acids (amino acids 29 to 213) that are most similar to a thrombospondin N-terminal-like domain. Thrombospondins are a family of related, adhesive glycoproteins, which are synthesized, secreted and incorporated into the extracellular matrix of a variety of cells, including alpha granules of platelets following thrombin activation and endothelial cells. They interact with a number of blood coagulation factors and anticoagulant factors, and are involved in cell adhesion, platelet aggregation, cell proliferation, angiogenesis, tumor metastasis, vascular smooth muscle growth and tissue repair. The first conserved domain also comprises amino acids (amino acids 82 to 206; amino acids 98 to 209) that are similar to a Laminin G-like domain. Laminin G-like (LamG) domains usually are Ca^{2+} mediated receptors that can have binding sites for steroids, β1-integrins, heparin, sulfatides, fibulin-1, and α-dystroglycans. Proteins that contain LamG

domains serve a variety of purposes, including signal transduction via cell-surface steroid receptors, adhesion, migration and differentiation through mediation of cell adhesion molecules.

Much of what is known about NELL1 concerns its role in bone development. See, e.g., U.S. Patent No. 7,884,066, U.S. Patent No. 7,833,968, U.S. Patent No. 7,807,787, U.S. Patent No. 7,776,361, U.S. Patent No. 7,691,607, U.S. Patent No. 7,687,462, U.S. Patent No. 7,544,486, and U.S. Patent no. 7,052,856, the entire contents of which are incorporated herein by reference. It generally is believed that during osteogenic differentiation, NELL1 signaling may involve an integrin-related molecule and tyrosine kinases that are triggered by NELL1 binding to a NELL1 specific receptor and a subsequent formation of an extracellular complex. As thus far understood, in human NELL1 (hNELL1), the laminin G domain comprises about 128 amino acid residues that show a high degree of similarity to the laminin G domain of extracellular matrix ("ECM") proteins, such as human laminin α3 chain (hLAMA3), mouse laminin α3 chain (mLAMA3), human collagen 11 α3 chain (hCOLA1), and human thrombospondin-1 (hTSP1). This complex facilitates either activation of Tyr-kinases, inactivation of Tyr phosphatases, or intracellular recruitment of Tyr-phosphorylated proteins. The ligand bound integrin (cell surface receptors that interact with ECM proteins such as, for example, laminin 5, fibronectin, vitronectin, TSP1/2) transduces the signals through activation of the focal adhesion kinase (FAK) followed by indirect activation of the Ras-MAPK cascade, and then leads to osteogenic differentiation through Runx2; the laminin G domain is believed to play a role in the interaction between integrins and a 67 kDa laminin receptor.

The second conserved domain (amino acids 273 to 331) and seventh conserved domain (amino acids 701 to 749; amino acids 703 to 749) are similar to von Willebrand factor type C (VWC) domains, also known as chordin-like repeats. VWC domains occur in numerous proteins of diverse functions. It is thought that these domains may be involved in protein oligomerization.

The third conserved domain (amino acids 434 to 471; amino acids 434 to 466), fourth conserved domain (amino acids 478 to 512), fifth conserved domain (amino acids 549 to 586; amino acids 549 to 582), and sixth conserved domain (amino acids 596 to 627; amino acids 596 to 634) are similar to a calcium-binding EGF-like domain. Calcium-binding EGF-like domains are present in a large number of membrane-bound and extracellular (mostly animal) proteins. Many of these proteins require calcium for their biological function. Calcium-binding sites have been found to be located at the N-terminus of particular EGF-like domains, suggesting that calcium-binding may be crucial for numerous protein-protein interactions. Six conserved core cysteines form three disulfide bridges as in non-calcium-binding EGF domains whose structures are very similar.

The nel-like 1 isoform 2 precursor transcript variant lacks an alternate in-frame exon compared to variant 1. The resulting isoform 2, which has the same N- and C-termini as isoform 1 but is shorter compared to isoform 1, has six conserved regions including a TSPN domain/LamG superfamily domain (amino acids 29 to 313); VWC domains (amino acids 273 to 331; amino acids 654 to 702); and calcium-binding EGF-like domains (amino acids 478 to 512; amino acids 434 to 471; amino acids 549 to 580).

NELL1 and its orthologs are found across several species including Homo sapiens (man), Mus musculus (mouse), Rattus norvegicus (rat), Pan troglodytes (chimpanzee), Xenopus (Silurana) tropicalis (frog), Canis lupus familiaris (dog), Culex quinquefasciatus (mosquito) Pediculus humanus corporis (head louse), Aedes aegypti (mosquito), Ixodes scapularis (tick), Strongylocentrotus purpuratus (purple sea urchin), and Acyrthosiphon pisum (pea aphid).

NELL1 is Variable

NELL1 comprises several regions susceptible to increased recombination. Studies have indicated that susceptibilities to certain diseases may be associated with genetic variations within these regions, suggesting the existence of more than one causal variant in the NELL1 gene. For example, in patients suffering irritable bowel syndrome ("IBS"), six different single nucleotide polymorphisms (SNPs) within NELL1

have been identified, with most of these SNPs near the 5' end of the gene and fewer at the 3' end. These include R136S and A153T (which reside in the TSPN) and R354W (which resides in a VWC domain). Additional studies have identified at least 26 variants comprising some of at least 263 SNPs within the NELL1 region.

NELL1-Function

The NELL1 protein is a secreted cytoplasmic heterotrimeric protein. The complete role NELL1 plays in vivo remains unknown.

Several studies have indicated that NELL1 may play a role in bone formation, inflammatory bowel disease, and esophageal adenocarcinoma, among others.

NELL1 in Osteogenesis

It generally is believed that NELL1 induces osteogenic differentiation and bone formation of osteoblastic cells during development. Studies have shown that the NELL1 protein (1) transiently activates the mitogen-activated protein kinase ("MAPK") signaling cascade (which is involved in various cellular activities such as gene expression, mitosis, differentiation, proliferation and apotosis); and (2) induces phosphorylation of Runx2 (a transcription factor associated with osteoblast differentiation). Consequently, it generally is believed that upon binding to a specific receptor, NELL1 transduces an osteogenic signal through activation of certain Tyr-kinases associated with the Ras-MAPK cascade, which ultimately leads to osteogenic differentiation. Studies have shown that bone development is severely disturbed in transgenic mice where over-expression of NELL1 has been shown to lead to craniosynotosis (premature ossification of the skull and closure of the sutures) and NELL1 deficiency manifests in skeletal defects due to reduced chondrogenesis and osteogenesis.

Additional studies have supported a role for NELL-1 as a craniosynostosis-related gene. For example, three regions within the NELL-1 promoter have been identified that are directly bound and transactivated by Runx2. Further, studies in rat skullcaps have indicated that forced expression of Runx2 induces NELL-1 expression (which is suggestive that Nell-1 is a downstream target of Runx2).

2. Cells of the Connective Tissue Compartment

The connective tissue compartment contains cells that primarily function to elaborate and maintain ECM structure. The character of the extracellular matrix is region-specific and is determined by the amount of the extracellular materials.

Common cell types of connective tissue compartments include: fibroblasts, macrophages, mast cells, and plasma cells. Specialized connective tissue compartments, such as cartilage, bone, and the vasculature, and those with special properties, such as adipose, tendons, ligaments, etc., have specialized cells to perform specialized functions.

2.1. Adipose Tissue Compartment

Adipose tissue compartments are dynamic, multifunctional, ubiquitous and loose connective tissue compartments. Adipose comprises fibroblasts, smooth muscle cells, endothelial cells, leukocytes, macrophages, and closely packed mature lipid-filled fat cells, termed adipocytes, with characteristic nuclei pushed to one side, embedded within an areolar matrix that are located in subcutaneous layers of skin and muscle (panniculus adiposus), in the kidney region, cornea, breasts, mesenteries, mediastinium, and in the cervical, axillary and inguinal regions. Adipocytes play a primary role in energy storage and in providing insulation and protection. As sites of energy storage, adipocytes regulate the accumulation or mobilization of triacylglycerol in response to the body's energy requirements and store energy in the form of a single fat droplet of triglycerides, included among the more general class of lipids.

Adipocyte Matrix

Each adipocyte is surrounded by a thick ECM called the basal lamina. The strong adipocyte ECM scaffold lowers mechanical stress by spreading forces over a large surface area of the adipose tissue compartments. The ECM composition of adipocytes is similar to that of other cell types, but it is the relative quantity of individual components that impart cell specificity. Adipocyte ECM is particularly enriched in collagen VI, a coiled coil comprising α1(VI), α2(VI) and α3(VI) subunits. Collagen VI

binds to collagen IV and also to other matrix proteins such as proteoglycans and fibronectin. Table 5 lists core proteins that have been annotated to the adipocyte ECM with current proteomic techniques. (Mariman et al., 2010, *Cell. Mol. Life Sci.*, 67:1277-1292).

Table 5: Core Proteins of Human Adipocyte ECM

Protein	Symbol
Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein (HSPG) (perlecan)	HSPG2
Calreticulin	CALR
Chitinase-3-like protein 1	CHI3l1
Coiled coil domain containing protein 80	CCDC80
Collagen α 1(I) chain	COL1A1
Collagen α 2(I) chain	COL1A2
Collagen α 1(III) chain	COL2A1
Collagen α 2(IV) chain	COL4A2
Collagen α 1(V) chain	COL5A1
Collagen α 1(VI) chain	COL6A1
Collagen α 2(VI) chain	COL6A2
Collagen α 3(VI) chain	COL6A3
Collagen α 1(XII) chain	COL12A1
Collagen α 1(XIV) chain (undulin)	COL14A1
Collagen α 1(XV) chain	COL15A1
Collagen α 1(XVIII) chain	COL18A1
Decorin (bone proteoglycan II)	DCN
Dermatopontin (tyrosine-rich acidic matrix protein; early quiescence protein 1)	DPT
Elastin microfibril interface-located protein 1	EMILIN1
Fibronectin (FN) (cold-insoluble globulin)	FN1
Fibulin-1	FBLN1
Fibulin-3 (EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1)	FBLN3
Fibulin-5 (developmental arteries and neural crest EGF-like protein	FBLN5
Galectin-1	LGALS1
Galectin-3-binding protein (lectin galactoside-binding soluble 3-binding protein)	LGALS3BP
Glypican 1	GPC1
Laminin α-4 chain	LAMA4
Laminin β-1 chain	LAMB1
Laminin β-2 chain	LAMB2
Laminin γ-1 chain	LAMC1
Lumican (keratan sulfate proteoglycan lumican)	LUM
Matrilin-2	MATN2
Microfibril-associated glycoprotein 4	MFAP4

Protein	Symbol
Mimecan (osteoglycin)	OGN
Nidogen 1 (entactin)	NID1
Nidogen 2 (osteonidogen)	NID2
Periostin	POSTN
Proteoglycan 4	PRG4
SPARC (osteonectin)	SPARC
Spondin-1 (F-spondin) (vascular smooth muscle cell growth-promoting factor)	SPON1
Spondin-2 (mindin)	SPON2
Tenascin-C (TN) (hexabrachion) (cytotactin) (neuronectin) (GMEM)	TNC
Tenascin-X	TNXB
Thrombospondin-1	THBS1
Thrombospondin-2	THBS2
Transforming growth factor-b-induced protein IG-H3 (bIG-H3)	TGFB1
Versican core protein (large fibroblast proteoglycan)	CSPG2
Versican V3 isoform	VCAN

Adipocyte ECM undergoes biphasic development during adipogenesis, the process of formation of mature adipose tissue compartments. There is an initial decrease in collagen I and III, whereas their levels come back to pre-differentiation state at later stages. Mature adipocyte ECM is maintained in a dynamic state with constant turnover of ECM components by a balance of activities of ECM constructive enzymes and ECM degradation enzymes. In early stages of differentiation, the balance is shifted towards the constructive factors. (Mariman et al., 2010, *Cell. Mol. Life Sci.*, 67:1277-1292). Maturation of newly synthesized ECM components is initiated in the ER lumen where ECM proteins undergo biochemical modifications and proteolytic processing prior to assembly. For collagen, such modifications include proline- and lysine- hydroxylation and glycosylation and clipping of N- and C-terminal peptides by respective procollagen-N- and –C-collagenase. Processed proteins are then assembled and secreted into the extracellular environment where they undergo further processing by secreted extracellular modification and processing enzymes. As the preadipocytes differentiate and begin to store fatty substances, including lipids, ECM assumes a basal laminar structure.

Adipose-derived Stem Cells

Adipose also comprises a population of pluripotent stem cells that have the potential to give rise to cells of all three embryonic lineages: ectodermal, mesodermal and endodermal. Adipogenesis, which comprises the steps of differentiation of such pluripotent cells to mature adipocytes, is initiated by differentiation of these pluripotent cells to give rise to a population of mesenchymal precursor cells or mesenchymal stem cells (MSCs), which have the potential to differentiate into a variety of mesodermal cell lineages such as for example, myoblasts, chondroblasts, osteoblasts and adipocytes. In the presence of appropriate environmental and gene expression signals, the MSCs go through growth arrest and differentiate into precursors with a determined fate that undergo clonal expansion, become committed and terminally differentiate to give rise to mature cells. The population of MSCs and more committed adipose progenitors that are found along with the stroma of adipose tissue collectively are termed adipose-derived stem cells (ASCs). These cells have a characteristic $CD45^{-}CD31^{-}$ $CD34^{+}CD105^{+}$ surface phenotype. In the case of adipocyte differentiation, ASCs differentiate to proadipocytes that undergo final differentiation to give rise to mature adipocytes. Mesenchymal progenitor cells with chondrogenic potential have also been identified in the infrapatellar fat pad in joints. (Lee et al., Tissue Engg. 2010, 16(1): 317-325).

Table 6 lists cell lineages and respective inductive factors that can be derived from ASC lines. (Brown *et. al.*, 2010, Plast. Reconstr. Surg., 126(6): 1936-1946; Gregoire et al., 1998, Physiol. Rev. 78(3): 783-809).

Table 6. Inductive Factors and Cell Lineages from Adipose-derived Stem Cells

Cell Lineage	Inductive Factors
Adipocyte	Dexamethasone; isobutyl methylxanthine,; indoxanthine; insulin; thiazolidinedione; nuclear hormone glucocorticoids, e.g., 3,3',5-triiodothyronine (T_3) and retinoic acid (RA); IGF-1; PGE_2
Cardiomyocyte	Transferrin; IL-3; IL-6; VEGF
Chondrocyte	Ascorbic acid; bone morphogenetic protein 6; dexamethasone; insulin; transforming growth factor-β (TGF-β)
Endothelial	EGM-2-MV medium (Cambrex, Walkersville, MD) containing ascorbate, epidermal growth factor, basic fibroblast growth factor, and hydrocortisone
Myocyte	Dexamethasone horse serum
Neuronal-like	Butylated hydroxianisole; valproic acid; insulin
Osteoblast	Ascorbic acid; bone morphogenetic protein-2; dexamethasone; 1,25-dihydroxyvitamin D

Adipose Secreted Factors

Adipose is considered a secretory organ. The adipose secretome not only includes structural and soluble factors contributing to the formation of the adipose matrix, but also a horde of soluble factors with endocrine function, such as growth factors, hormones, chemokines and lipids, collectively termed adipokines. Exemplary adipokines include, without limitation, leptin, adiponectin, resistin, interleukin 6 (IL-6), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), tumor necrosis factor alpha (TNF-α); fibroblast growth factor (FGF), and vascular endothelial growth factor (VEGF). Exemplary immunogical adipokines, particularly involved in inflammatory pathways include, without limitation, serum amyloid A3 (SAA3), IL-6, adiponectin, TNF-α and haptoglobin. Exemplary adipokines involved in the production of new blood vessels include, without limitation, angiopoietin-1, angiopoietin-2, VEGF, transforming growth factor beta (TGF-β), hepatic growth factor (HGF), stromal derived growth factor 1 (SDF-1), TNF-α , resistin, leptin, tissue factor, placental growth factor (PGF), insulin like growth factor (IGF), and monobutyrin.

Adiponectin, a key metabolic factor secreted from adipocytes, is a 30-KDa protein that may exist as a trimer, low molecular weight hexamers or high molecular weight 18mers. Adiponectin circulates throughout the plasma and has a variety of metabolic effects including, but not limited to, glucose lowering and cardioprotection stimulation of smooth muscle proliferation. Adiponectin has been implicated in a number of pathological conditions including, but not limited to diabetes, obesity, metabolic syndrome, cardiovascular disease and wound healing.

Resistin, a member of the resistin-like (RELM) hormone family, is secreted by stromal vascular cells of adipose. Resistin is secreted in two multimeric isoforms and functions to counterbalance the insulin sensitizing effects of adiponectin. (Truillo, M.E. and Scherer P.E., Endocrine Rev. 2006, 27(7): 762-778).

Secretions from resident adipocytes, macrophages and ASCs collectively contribute to the adipose secretome. Table 7 provides a reported adipokine profile of ASCs. (Kilroy *et. al.*, 2007, J. Cell. Physiol. 212: 702-709.)

Table 7. Reported Adipokine Profile of Human ASCs

Function	Adipokine
Angiogenic	HGF
	VEGF
Hematopoietic	Flt-3 ligand
	G-CSF
	GM-CSF
	IL-7
	IL-12
	M-CSF
	SCF
Proinflammatory	IL-1alpha
	IL-6
	IL-8
	IL-11
	LIF
	TNF-alpha

Transcription Factors Responsible for Adipogenesis

Adipocyte differentiation involves the crosstalk between external signals in the ECM environment with internal signals generated from the nucleus. The peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) and CCAAT-enhancer-binding proteins (C/EBP) family of transcription factors play an important role in adipogenesis. The PPARs, members of type II nuclear hormone receptor family, form heterodimers with the retinoid X receptor (RXR). They regulate transcription by binding of PPAR-RXR heteridimers to a response element characterized by a direct repeat of the nuclear receptor hexameric DNA recognition motif, PuGG-TCA. PPAR-γ is most adipose-specific of all PPARs and is activated prior to transcriptional up-regulation of most other adipocyte genes. The C/EBP family of transcription factors are also induced prior to activation of other adipocyte genes and plays a major role in adipocyte differentiation. Members of the basic helix-loop-helix (bHLH) family of transcription factors have also been implicated in adipogenesis. (Gregoire et al., 1998, Physiol. Rev. 78(3): 783-809).

2.2. Bone (Osseous) Tissue Compartment

Osseous tissue is a rigid form of connective tissue normally organized into definite structures, the bones. These form the skeleton, serve for the attachment and protection of the soft parts, and, by their attachment to the muscles, act as levers that bring about body motion. Bone is also a storage place for calcium that can be withdrawn when needed to maintain a normal level of calcium in the blood.

Bones can be classified according to their shape. Examples of bone types include: long bones whose length is greater than their widths (e.g., femur (thigh bone), humerus (long bone of the upper limb), tibia (shin bone), fibula (calf bone), radius (the outer of the two bones of the forearm), and ulna (inner of two bones of the forearm)), short bones whose length and width is approximately equal (e.g., carpals bones (wrist bones in the hand)), flat bones (e.g., cranium (skull bones surrounding the brain), scapula (shoulder blade), and ilia (the uppermost and largest bone of the pelvis)), irregular bones (e.g., vertebra), and sesamoid bones, small bones present in the joints

to protect tendons (fibrous connective tissues that connect muscles to the bones, e.g., patella bones (knee cap)).

Grossly, two types of bone may be distinguished: cancellous, trabecular or spongy bone, and cortical, compact, or dense bone.

Cortical bone, also referred to as compact bone or dense bone, is the tissue of the hard outer layer of bones, so-called due to its minimal gaps and spaces. This tissue gives bones their smooth, white, and solid appearance. Cortical bone consists of haversian sites (the canals through which blood vessels and connective tissue pass in bone) and osteons (the basic units of structure of cortical bone comprising a haversian canal and its concentrically arranged lamellae), so that in cortical bone, bone surrounds the blood supply. Cortical bone has a porosity of about 5% to about 30% , and accounts for about 80% of the total bone mass of an adult skeleton.

Cancellous Bone (Trabecular or Spongy Bone)

Cancellous bone tissue, an open, cell-porous network also called trabecular or spongy bone, fills the interior of bone and is composed of a network of rod- and plate-like elements that make the overall structure lighter and allows room for blood vessels and marrow so that the blood supply surrounds bone. Cancellous bone accounts for the remaining 20% of total bone mass but has nearly ten times the surface area of cortical bone. It does not contain haversian sites and osteons and has a porosity of about 30% to about 90%.

The head of a bone, termed the epiphysis, has a spongy appearance and consists of slender irregular bone trabeculae, or bars, which anastomose to form a lattice work, the interstices of which contain the marrow, while the thin outer shell appears dense. The irregular marrow spaces of the epiphysis become continuous with the central medullary cavity of the bone shaft, termed the diaphysis, whose wall is formed by a thin plate of cortical bone.

Both cancellous and cortical bone have the same types of cells and intercellular substance, but they differ from each other in the arrangement of their components and in the ratio of marrow space to bone substance. In cancellous bone, the marrow spaces are relatively large and irregularly arranged, and the bone substance is in the form of slender anastomosing trabeculae and pointed spicules. In cortical bone, the spaces or channels are narrow and the bone substance is densely packed.

With very few exceptions, the cortical and cancellous forms are both present in every bone, but the amount and distribution of each type vary considerably. The diaphyses of the long bones consist mainly of cortical tissue; only the innermost layer immediately surrounding the medullary cavity is cancellous bone. The tabular bones of the head are composed of two plates of cortical bone enclosing marrow space bridged by irregular bars of cancellous bone. The epiphyses of the long bones and most of the short bones consist of cancellous bone covered by a thin outer shell of cortical bone.

Each bone, except at its articular end, is surrounded by a vascular fibroelastic coat, the periosteum. The so-called endosteum, or inner periosteum of the marrow cavity and marrow spaces, is not a well-demarcated layer; it consists of a variable concentration of medullary reticular connective tissue that contains osteogenic cells that are in immediate contact with the bone tissue.

Components of Bone

Bone is composed of cells and an intercellular matrix of organic and inorganic substances.

The organic fraction consists of collagen, glycosaminoglycans, proteoglycans, and glycoproteins. The protein matrix of bone largely is composed of collagen, a family of fibrous proteins that have the ability to form insoluble and rigid fibers. The main collagen in bone is type I collagen.

The inorganic component of bone, which is responsible for its rigidity and may constitute up to two-thirds of its fat-free dry weight, is composed chiefly of calcium

phosphate and calcium carbonate, in the form of calcium hydroxyapatite, with small amounts of magnesium hydroxide, fluoride, and sulfate. The composition varies with age and with a number of dietary factors. The bone minerals form long fine crystals that add strength and rigidity to the collagen fibers; the process by which it is laid down is termed mineralization.

Bone Cells

Four cell types in bone are involved in its formation and maintenance. These are 1) osteoprogenitor cells, 2) osteoblasts, 3) osteocytes, and 4) osteoclasts.

Osteoprogenitor Cells

Osteoprogenitor cells arise from mesenchymal cells, and occur in the inner portion of the periosteum and in the endosteum of mature bone. They are found in regions of the embryonic mesenchymal compartment where bone formation is beginning and in areas near the surfaces of growing bones. Structurally, osteoprogenitor cells differ from the mesenchymal cells from which they have arisen. They are irregularly shaped and elongated cells having pale-staining cytoplasm and pale-staining nuclei. Osteoprogenitor cells, which multiply by mitosis, are identified chiefly by their location and by their association with osteoblasts. Some osteoprogenitor cells differentiate into osteocytes. While osteoblasts and osteocytes are no longer mitotic, it has been shown that a population of osteoprogenitor cells persists throughout life.

Osteoblasts

Osteoblasts, which are located on the surface of osteoid seams (the narrow region on the surface of a bone of newly formed organic matrix not yet mineralized), are derived from osteoprogenitor cells. They are immature, mononucleate, bone-forming cells that synthesize collagen and control mineralization. Osteoblasts can be distinguished from osteoprogenitor cells morphologically; generally they are larger than osteoprogenitor cells, and have a more rounded nucleus, a more prominent nucleolus,

and cytoplasm that is much more basophilic. Osteoblasts make a protein mixture known as osteoid, primarily composed of type I collagen, which mineralizes to become bone. Osteoblasts also manufacture hormones, such as prostaglandins, alkaline phosphatase, an enzyme that has a role in the mineralization of bone, and matrix proteins.

Osteocytes

Osteocytes, star-shaped mature bone cells derived from osteoblasts and the most abundant cell found in compact bone, maintain the structure of bone. Osteocytes, like osteoblasts, are not capable of mitotic division. They are actively involved in the routine turnover of bony matrix and reside in small spaces, cavities, gaps or depressions in the bone matrix called lacuna. Osteocytes maintain the bone matrix, regulate calcium homeostasis, and are thought to be part of the cellular feedback mechanism that directs bone to form in places where it is most needed. Bone adapts to applied forces by growing stronger in order to withstand them; osteocytes may detect mechanical deformation and mediate bone-formation by osteoblasts.

Osteoclasts

Osteoclasts, which are derived from a monocyte stem cell lineage and possess phagocytic-like mechanisms similar to macrophages, often are found in depressions in the bone referred to as Howship's lacunae. They are large multinucleated cells specialized in bone resorption. During resorption, osteoclasts seal off an area of bone surface; then, when activated, they pump out hydrogen ions to produce a very acid environment, which dissolves the hydroxyapatite component. The number and activity of osteoclasts increase when calcium resorption is stimulated by injection of parathyroid hormone (PTH), while osteoclastic activity is suppressed by injection of calcitonin, a hormone produced by thyroid parafollicular cells.

Bone Matrix

The bone matrix accounts for about 90% of the total weight of compact bone and is composed of microcrystalline calcium phosphate resembling hydroxyapatite (60%) and fibrillar type I collagen (27%). The remaining 3% consists of minor collagen types

and other proteins including osteocalcin, osteonectin, osteopontin, bone sialoprotein, as well as proteoglycans, glycosaminoglycans, and lipids.

Bone matrix is also a major source of biological information that skeletal cells can receive and act upon. For example, extracellular matrix glycoproteins and proteoglycans in bone bind a variety of growth factors and cytokines, and serve as a repository of stored signals that act on osteoblasts and osteoclasts. Examples of growth factors and cytokines found in bone matrix include, but are not limited to, Bone Morphogenic Proteins (BMPs), Epidermal Growth Factors (EGFs), Fibroblast Growth Factors (FGFs), Platelet-Derived Growth Factors (PDGFs), Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1), Transforming Growth Factors (TGFs), Bone-Derived Growth Factors (BDGFs), Cartilage-Derived Growth Factor (CDGF), Skeletal Growth Factor (hSGF), Interleukin-1 (IL-1), and macrophage-derived factors.

There is an emerging understanding that extracellular matrix molecules themselves can serve regulatory roles, providing both direct biological effects on cells as well as key spatial and contextual information.

The Periosteum and Endosteum

The periosteum is a fibrous connective tissue investment of bone, except at the bone's articular surface. Its adherence to the bone varies by location and age. In young bone, the periosteum is stripped off easily. In adult bone, it is more firmly adherent, especially so at the insertion of tendons and ligaments, where more periosteal fibers penetrate into the bone as the perforating fibers of Sharpey (bundles of collagenous fibers that pass into the outer circumferential lamellae of bone). The periosteum consists of two layers, the outer of which is composed of coarse, fibrous connective tissue containing few cells but numerous blood vessels and nerves. The inner layer, which is less vascular but more cellular, contains many elastic fibers. During growth, an osteogenic layer of primitive connective tissue forms the inner layer of the periosteum. In the adult, this is represented only by a row of scattered, flattened cells closely applied to the bone. The periosteum serves as a supporting bed for the

blood vessels and nerves going to the bone and for the anchorage of tendons and ligaments. The osteogenic layer, which is considered a part of the periosteum, is known to furnish osteoblasts for growth and repair, and acts as an important limiting layer controlling and restricting the extend of bone formation. Because both the periosteum and its contained bone are regions of the connective tissue compartment, they are not separated from each other or from other connective tissues by basal laminar material or basement membranes. Perosteal stem cells have been shown to be important in bone regeneration and repair. (Zhang et al., 2005, J. Musculoskelet. Neuronal. Interact. 5(4): 360-362).

The endosteum lines the surface of cavities within a bone (marrow cavity and central canals) and also the surface of trabeculae in the marrow cavity. In growing bone, it consists of a delicate striatum of myelogenous reticular connective tissue, beneath which is a layer of osteoblasts. In the adult, the osteogenic cells become flattened and are indistinguishable as a separate layer. They are capable of transforming into osteogenic cells when there is a stimulus to bone formation, as after a fracture.

Marrow

The marrow is a soft connective tissue that occupies the medullary cavity of the long bones, the larger central canals, and all of the spaces between the trabeculae of spongy bone. It consists of a delicate reticular connective tissue, in the meshes of which lie various kinds of cells. Two varieties of marrow are recognized: red and yellow. Red marrow is the only type found in fetal and young bones, but in the adult it is restricted to the vertebrae, sternum, ribs, cranial bones, and epiphyses of long bones. It is the chief site for the genesis of blood cells in the adult body. Yellow marrow consists primarily of fat cells that gradually have replaced the other marrow elements. Under certain conditions, the yellow marrow of old or emaciated persons loses most of its fat and assumes a reddish color and gelatinous consistency, known as gelatinous marrow. With adequate stimulus, yellow marrow may resume the character of red marrow and play an active part in the process of blood development.

Osteogenesis or Ossification

Osteogenesis or ossification is a process by which the bones are formed. There are three distinct lineages that generate the skeleton. The somites generate the axial skeleton, the lateral plate mesoderm generates the limb skeleton, and the cranial neural crest gives rise to the branchial arch, craniofacial bones, and cartilage. There are two major modes of bone formation, or osteogenesis, and both involve the transformation of a preexisting mesenchymal tissue into bone tissue. The direct conversion of mesenchymal tissue into bone is called intramembranous ossification. This process occurs primarily in the bones of the skull. In other cases, mesenchymal cells differentiate into cartilage, which is later replaced by bone. The process by which a cartilage intermediate is formed and replaced by bone cells is called endochondral ossification.

Intramembranous ossification

Intramembraneous ossification is the characteristic way in which the flat bones of the scapula, the skull and the turtle shell are formed. In intramembraneous ossification, bones develop sheets of fibrous connective tissue. During intramembranous ossification in the skull, neural crest-derived mesenchymal cells proliferate and condense into compact nodules. Some of these cells develop into capillaries; others change their shape to become osteoblasts, committed bone precursor cells. The osteoblasts secrete a collagen-proteoglycan matrix that is able to bind calcium salts. Through this binding, the prebone (osteoid) matrix becomes calcified. In most cases, osteoblasts are separated from the region of calcification by a layer of the osteoid matrix they secrete. Occasionally, osteoblasts become trapped in the calcified matrix and become osteocytes. As calcification proceeds, bony spicules radiate out from the region where ossification began, the entire region of calcified spicules becomes surrounded by compact mesenchymal cells that form the periosteum, and the cells on the inner surface of the periosteum also become osteoblasts and deposit osteoid matrix parallel to that of the existing spicules. In this manner, many layers of bone are formed.

Intramembraneous ossification is characterized by invasion of capillaries into the mesenchymal zone, and the emergence and differentiation of mesenchymal cells into mature osteoblasts, which constitutively deposit bone matrix leading to the formation of bone spicules, which grow and develop, eventually fusing with other spicules to form trabeculae. As the trabeculae increase in size and number they become interconnected forming woven bone (a disorganized weak structure with a high proportion of osteocytes), which eventually is replaced by more organized, stronger, lamellar bone.

The molecular mechanism of intramembranous ossification involves bone morphogenetic proteins (BMPs) and the activation of a transcription factor called CBFA1. Bone morphogenetic proteins, for example, BMP2, BMP4, and BMP7, from the head epidermis are thought to instruct the neural crest-derived mesenchymal cells to become bone cells directly. BMPs activate the Cbfa1 gene in mesenchymal cells. The CBFA1 transcription factor is known to transform mesenchymal cells into osteoblasts. Studies have shown that the mRNA for mouse CBFA1 is largely restricted to the mesenchymal condensations that form bone, and is limited to the osteoblast lineage. CBFA1 is known to activate the genes for osteocalcin, osteopontin, and other bone-specific extracellular matrix proteins.

Endochondral Ossification (Intracartilaginous Ossification)

Endochondral ossification, which involves the in vivo formation of cartilage tissue from aggregated mesenchymal cells, and the subsequent replacement of cartilage tissue by bone, can be divided into five stages. The skeletal components of the vertebral column, the pelvis, and the limbs are first formed of cartilage and later become bone.

First, the mesenchymal cells are committed to become cartilage cells. This commitment is caused by paracrine factors that induce the nearby mesodermal cells to express two transcription factors, Pax1 and Scleraxis. These transcription factors are known to activate cartilage-specific genes. For example, Scleraxis is expressed in the mesenchyme from the sclerotome, in the facial mesenchyme that forms cartilaginous precursors to bone, and in the limb mesenchyme.

During the second phase of endochondral ossification, the committed mesenchyme cells condense into compact nodules and differentiate into chondrocytes (cartilage cells that produce and maintain the cartilaginous matrix, which consists mainly of collagen and proteoglycans). Studies have shown that N-cadherin is important in the initiation of these condensations, and N-CAM is important for maintaining them. In humans, the SOX9 gene, which encodes a DNA-binding protein, is expressed in the precartilaginous condensations.

During the third phase of endochondral ossification, the chondrocytes proliferate rapidly to form the model for bone. As they divide, the chondrocytes secrete a cartilage-specific extracellular matrix.

In the fourth phase, the chondrocytes stop dividing and increase their volume dramatically, becoming hypertrophic chondrocytes. These large chondrocytes alter the matrix they produce (by adding collagen X and more fibronectin) to enable it to become mineralized by calcium carbonate.

The fifth phase involves the invasion of the cartilage model by blood vessels. The hypertrophic chondrocytes die by apoptosis, and this space becomes bone marrow. As the cartilage cells die, a group of cells that have surrounded the cartilage model differentiate into osteoblasts, which begin forming bone matrix on the partially degraded cartilage. Eventually, all the cartilage is replaced by bone. Thus, the cartilage tissue serves as a model for the bone that follows.

The replacement of chondrocytes by bone cells is dependent on the mineralization of the extracellular matrix. A number of events lead to the hypertrophy and mineralization of the chondrocytes, including an initial switch from aerobic to anaerobic respiration, which alters their cell metabolism and mitochondrial energy potential. Hypertrophic chondrocytes secrete numerous small membrane-bound vesicles into the extracellular matrix. These vesicles contain enzymes that are active in the generation of calcium and phosphate ions and initiate the mineralization process within the cartilaginous matrix. The hypertrophic chondrocytes, their metabolism and mitochondrial membranes altered, then die by apoptosis.

In the long bones of many mammals (including humans), endochondral ossification spreads outward in both directions from the center of the bone. As the ossification front nears the ends of the cartilage model, the chondrocytes near the ossification front proliferate prior to undergoing hypertrophy, pushing out the cartilaginous ends of the bone. The cartilaginous areas at the ends of the long bones are called epiphyseal growth plates. These plates contain three regions: a region of chondrocyte proliferation, a region of mature chondrocytes, and a region of hypertrophic chondrocytes. As the inner cartilage hypertrophies and the ossification front extends farther outward, the remaining cartilage in the epiphyseal growth plate proliferates. As long as the epiphyseal growth plates are able to produce chondrocytes, the bone continues to grow.

Bone Remodeling

Bone constantly is broken down by osteoclasts and re-formed by osteoblasts in the adult. It has been reported that as much as 18% of bone is recycled each year through the process of renewal, known as bone remodeling, which maintains bone's rigidity. The balance in this dynamic process shifts as people grow older: in youth, it favors the formation of bone, but in old age, it favors resorption.

As new bone material is added peripherally from the internal surface of the periosteum, there is a hollowing out of the internal region to form the bone marrow cavity. This destruction of bone tissue is due to osteoclasts that enter the bone through the blood vessels. Osteoclasts dissolve both the inorganic and the protein portions of the bone matrix. Each osteoclast extends numerous cellular processes into the matrix and pumps out hydrogen ions onto the surrounding material, thereby acidifying and solubilizing it. The blood vessels also import the blood-forming cells that will reside in the marrow for the duration of the organism's life.

The number and activity of osteoclasts must be tightly regulated. If there are too many active osteoclasts, too much bone will be dissolved, and osteoporosis will result. Conversely, if not enough osteoclasts are produced, the bones are not hollowed out for

the marrow, and osteopetrosis (known as stone bone disease, a disorder whereby the bones harden and become denser) will result.

Bone Regeneration and Fracture Repair

A fracture, like any traumatic injury, causes hemorrhage and tissue destruction. The first reparative changes thus are characteristic of those occurring in any injury of soft tissue. Proliferating fibroblasts and capillary sprouts grow into the blood clot and injured area, thus forming granulation tissue. The area also is invaded by polymorphonuclear leukocytes and later by macrophages that phagocytize the tissue debris. The granulation tissue gradually becomes denser, and in parts of it, cartilage is formed. This newly formed connective tissue and cartilage is designated as a callus. It serves temporarily in stabilizing and binding together the fractured bone. As this process is taking place, the dormant osteogenic cells of the periosteum enlarge and become active osteoblasts. On the outside of the fractured bone, at first at some distance from the fracture, osseous tissue is deposited. This formation of new bone continues toward the fractured ends of the bone and finally forms a sheath-like layer of bone over the fibrocartilaginous callus. As the amount of bone increases, osteogenic buds invade the fibrous and cartilaginous callus and replace it with a bony one. The cartilage undergoes calcification and absorption in the replacement of the fibrocartilaginous callus and intramembraneous bone formation also takes place. The newly formed bone is at first a spongy and not a compact type, and the callus becomes reduced in diameter. At the time when this subperiosteal bone formation is taking place, bone also forms in the marrow cavity. The medullary bone growing centripetally from each side of the fracture unites, thus aiding the bony union.

The process of repair is, in general, an orderly process, but it varies greatly with the displacement of the fractured ends of the bone and the degree of trauma inflicted. Uneven or protruding surfaces gradually are removed, and the healed bone, especially, in young individuals, assumes its original contour.

Osteogenesis and Angiogenesis

Skeletal development and fracture repair includes the coordination of multiple events such as migration, differentiation, and activation of multiple cell types and tissues. The development of a microvasculature and microcirculation is important for the homeostasis and regeneration of living bone, without which the tissue would degenerate and die. Recent developments using in vitro and in vivo models of osteogenesis and fracture repair have provided a better understanding of the recruitment nature of the vasculature in skeletal development and repair.

The vasculature transports oxygen, nutrients, soluble factors and numerous cell types to all tissues in the body. The growth and development of a mature vascular structure is one of the earliest events in organogenesis. In mammalian embryonic development, the nascent vascular networks develop by aggregation of de novo forming angioblasts into a primitive vascular plexus (vasculogenesis). This undergoes a complex remodeling process in which sprouting, bridging and growth from existing vessels (angiogenesis) leads to the onset of a functional circulatory system.

The factors and events that lead to the normal development of the embryonic vasculature are recapitulated during situations of neoangiogenesis in the adult. There are a number of factors involved in neoangiogenesis; these include, but are not limited to, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), various members of the Transforming Growth factor beta (TGFβ) family and Hypoxia-Inducible Transcription Factor (HIF). Other factors that have angiogenic properties include the Angiopoietins, (Ang-1); Hepatocyte Growth Factor (HGF); Platelet-Derived Growth Factor (PDGF); Insulin-like Growth Factor family (IGF-1, IGF-2) and the Neurotrophins (NGF).

The VEGFs and their corresponding receptors are key regulators in a cascade of molecular and cellular events that ultimately lead to the development of the vascular system, either by vasculogenesis, angiogenesis, or in the formation of the lymphatic

vascular system. Although VEGF is a critical regulator in physiological angiogenesis, it also plays a significant role in skeletal growth and repair.

In the mature established vasculature, the endothelium plays an important role in the maintenance of homeostasis of the surrounding tissue by providing the communicative network to neighboring tissues to respond to requirements as needed. Furthermore, the vasculature provides growth factors, hormones, cytokines, chemokines and metabolites, and the like, needed by the surrounding tissue and acts as a barrier to limit the movement of molecules and cells. Signals and attractant factors expressed on the bone endothelium help recruit circulating cells, particularly hematopoietic cells, to the bone marrow and coordinate with metastatic cells to target them to skeletal regions. Thus, any alteration in the vascular supply to bone tissue can lead to skeletal pathologies, such as osteonecrosis (bone death caused by reduced blood flow to bones), osteomyelitis (infection of the bone or bone marrow by microorganism), and osteoporosis (loss of bone density). A number of factors have been found to have a prominent effect on the pathology of the vasculature and skeleton, including Osteoprotegerin (OPG), which inhibits Receptor Activator of NF-κB Ligand (RANKL)-induced osteoclastogenic bone resorption.

Both intramembraneous and endochondral bone ossification occur in close proximity to vascular ingrowth. In endochondral ossification, the coupling of chondrogenesis and osteogenesis to determine the rate of bone ossification is dependent on the level of vascularization of the growth plate. For example, vascular endothelial growth (VEGF) factor isoforms are essential in coordinating metaphyseal and epiphyseal vascularization, cartilage formation, and ossification during endochondral bone development. HIF-1 stimulates transcription of the VEGF gene (and of other genes whose products are needed when oxygen is in short supply). The VEGF protein is secreted, diffuses through the tissue, and acts on nearby endothelial cells.

The response of the endothelial cells includes at least four components. First, the cells produce proteases to digest their way through the basal lamina of the parent capillary or venule. Second, the endothelial cells migrate toward the source of the

signal. Third, the cells proliferate. Fourth, the cells form tubes and differentiate. VEGF acts on endothelial cells selectively to stimulate this entire set of effects. Other growth factors, including some members of the fibroblast growth factor family, also can stimulate angiogenesis, but they influence other cell types besides endothelial cells. As the new vessels form, bringing blood to the tissue, the oxygen concentration rises, HIF-1 activity declines, VEGF production is shut off, and angiogenesis ceases.

The vascularization of cartilage regions in long bones occurs at different stages of development. In early embryonic development, blood vessels that originate from the perichondrium invaginate into the cartilage structures. During elevated postnatal growth, capillaries invade the growth plate of long bones. In adulthood, angiogenesis periodically can be switched on during bone remodeling in response to bone trauma or pathophysiological conditions such as rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis (OA).

Bone has the unique capacity to regenerate without the development of a fibrous scar, which is symptomatic of soft tissue healing of wounds. This is achieved through the complex interdependent stages of the healing process, which mimic the tightly regulated development of the skeleton. Following trauma with damage to the musculoskeletal system, disruption of the vasculature leads to acute necrosis and hypoxia of the surrounding tissue. This disruption of the circulation leads to the activation of thrombotic factors in a coagulation cascade leading to the formation of a hematoma. The inflammatory response and tissue breakdown activate factors such as cytokines and growth factors that recruit osteoprogenitor and mesenchymal cells to the fracture site. The stimulation of the endosteal circulation in the fractured bone allows mesenchymal cells associated with growing capillaries to invade the wound region from the endosteum and bone marrow. At the edge of a bone fracture, the transiently formed granulation tissue is replaced by fibrocartilage. Concomitantly, the periosteum directly undergoes intramembranous bone formation leading to the formation of an external callus; while internally, the tissue is being mineralized to form woven bone. After stabilization of the bone tissue and vasculature in the bone fracture, the cell-mediated remodeling cascade is activated where osteoclastic removal of necrotic bone is followed

by the replacement of the large fracture callus by lamellar bone, the callus size is reduced, and the normal vascular supply is restored.

A plurality of mediators associated with fetal and postnatal bone development plays a prominent role in the cascade response in bone fracture repair. These include but are not limited to BMP-2 and 4, VEGF, bFGF, TGF-β, and PDGF. VEGF expression is detected on chondroblasts, chondrocytes, osteoprogenitor cells and osteoblasts in the fracture callus where it is highly expressed in angioblasts, osteoprogenitor and osteoblast cells during the first seven days of healing but decreases after eleven days. Additionally, osteoclasts release heparinase that induces the release of the active form of VEGF from heparin, activating not only angiogenesis but also osteoclast recruitment, differentiation and activity leading to the remodeling of the fracture callus during endochondral ossification. Fractures in some cases fail to repair or unite resulting in fibrous filled pseudarthrosis. A number of contributing factors can lead to non-union or delayed union of bone fractures, such as, but not limited to, anti-inflammatory drugs, steroids, Vitamin C, Vitamin D and calcium deficiencies, tobacco smoking, diabetes, and other physiological disorders.

The absence of a functional vascular network is also an important factor in the lack of bone healing in non-union fractures. Studies have reported that angiogenic factors released from biomimetic scaffolds can enhance bone regeneration and that combination strategies that release both angiogenic and osteogenic factors can enhance the regenerative capacity of bone.

The critical sequential timing of osteoclast differentiation and activation, angiogenesis, recruitment of osteoprogenitor cells and the release of growth factors such as BMP-2 in osteogenesis and fracture repair may be enhanced by the synchronized endogenous production of angiogenic and osteogenic mediators. Studies in rat femoral drill-hole injury have shown differential expression of VEGF splicing isoforms along with its receptors, indicating an important role in the bone healing process. Other studies have demonstrated that angiogenesis occurs predominantly before the onset of osteogenesis in bone lengthening in an osteodistraction model.

Another angiogenic inducing growth factor, FGF-2, can accelerate fracture repair when added exogenously to the early healing stage of a bone. Although the mechanism has not been fully elucidated, it has the ability to stimulate angiogenesis and the proliferation and differentiation of osteoblasts to possibly aid the repair of bone fractures.

2.3. Cartilaginous Tissue Compartments

Cartilaginous tissue compartments are specialized connective tissue compartments comprising cartilage cells, known as chondrocytes, cartilage fibers and ground substance constituting the cartilage matrix, that collectively contribute to characteristic elastic firmness rendering cartilage capable of withstanding high levels of pressure or sheer. Cartilage is histologically classified into three types depending on its molecular composition: hyaline cartilage; fibrocartilage and elastic cartlage.

Hyaline cartilage is the predominant form of cartilage comprising an amorphous matrix surrounding chondrocytes embedded within spaces, known as lacunae. Hyaline cartilage, which is commonly associated with the skeletal system and found in the nose, trachea, bronchi and larynx, predominantly functions to provide support. Hyaline cartilage associated with the articular portions of bone, forming the major component of synovial joints, is termed articular cartilage. Hyaline cartilage is usually avascular except where vessels may pass through to supply other tissues and in ossification centers involved in intracartilaginous bone development.

Fibrocartilage, which is commonly found in intervertebral discs and pubic symphysis and functions to provide tensile strength and in shock absorption, is less firm than hyaline cartilage. It comprises a combination of dense collagenous fibers with cartilage cells and a scant cartilage matrix. Fibrocartilage is not usually circumscribed by a perichondrium. Proportions of cells, fibers and ECM components in fribrocartilage are variable.

Elastic cartilage, which is found in the external ear, the Eustachian tube, epiglottis and some of the lanryngeal cartilages, is characterized by a large number of

elastic fibers that branch and course in all directions to form a dense network of anastomising and interlacing fibers.

Articular Cartilage Matrix

The chondrocytes in articular cartilage are surrounded by a narrow region of connective tissue ECM, termed the pericellular matrix (PCM), which together with the chondrocyte, is termed chondron. The PCM, which is very rich in fibronectin, proteoglycans (e.g., aggrecan, hyaluron and decorin) and collagen (types II, VI and IX), is particularly characterized by a high concentration of type VI collagen as compared to the surrounding ECM. In normal articular cartilage, type VI collagen is restricted to the chondrons, but in osteoarthritic cartilage, it is upregulated and found throughout the ECM. A proteomic analysis of articular cartilage revealed the presence of collagen α1(II) C-propeptide, collagen α1(XI) C-propeptide, collagen α2(XI) C-propeptide, collagen α1(VI), collagen α2(VI), link protein, biglycan,.decorin, osteonectin, matrillin-1, annexin-V, lactadherin, and binding immunoglobulin protein (BiP), in addition to metabolic proteins. (Wilson *et. al.*, 2008, Methods, 48: 22-31).

Chondrocyte differentiation

The specific structure of articular cartilage, with endogenous chondrocytes forming adult joints, is the result of endochondral ossification, as described above under the heading, Osseous Tissue Compartments Formation.

Chondrocyte differentiation and maintenance in articular cartilage is governed by interaction of multiple factors. Key players include, but are not limited to, ions (e.g., calcium); steroids (e.g., estrogens); terpenoids (e.g., retinoic acid); peptides (e.g., Parathyroid hormone (PTH), parathyroid hormone-related peptide (PTHrP)), insulin growth factors (e.g., TGFβ hormones, including, without limitation, BMPs, IGF-1, VEGF, PDGF, FGF); transcription factors (e.g., Wnt, SOX-9); eicosanoids (e.g., prostaglandins); catabolic interleukins (e.g., IL-1); and anabolic interleukins (e.g., IL-6, IL-4 and IL-10). (Gaissmaier et al., 2008, Int. J. Care Injured, 39S1: S88-S96).

Growth Plate

The epiphyseal plates or growth plates are a hyaline cartilage plate located in the metaphysis at the end of long bones. Whereas endochondral ossification is responsible for the formation of cartilage in utero and in infants, the growth plates are responsible for the longitudinal growth of long bones via a cartilage template. The ongoing developmental processes of proliferation and differentiation within the growth plates are mediated by a number of hormonal and paracrine factors secreted by the growth plate chondrocytes. The growth plate is a highly organized structure comprising a large number of chondrocytes in various stages of differentiation and proliferation embedded in a scaffold of ECM components.

The growth plate can be subdivided into four zones depending on the stage of differentiation and spatial distribution of collagen types. The resting zone is the smallest zone close to the epiphyseal cartilage comprising small monomorphic chondrocytes with a narrow rim of cytoplasm. The chondrocytes of the resting zone secrete growth plate orienting factor (GPOF) that aligns proliferating cells parallel to the long axis of the developing bone. Stem cell-like cells of the resting zone have a limited proliferative capacity, which eventually leads to fusion of the growth plate (epiphyseal fusion). The proliferative zone of the growth plate comprises chondrocytes that are arranged in characteristic columns parallel to the longitudinal axis of the bone and are separated by ECM with high type II collagen. The chondrocytes of the proliferative zone are mitotically active, have high oxygen and glycogen content, and exhibit increased mitochondrial ATP production. The hypertrophic zone refers to the zone farthest from the resting zone where prehypertrophic chondrocytes stop dividing and terminally differentiate into elongated hypertrophic chondrocytes embedded in ECM high in type X collagen. Hypertrophic chondrocytes have a high intracellular calcium concentration required for the production of release vesicles containing Ca^{2+}-binding annexins, that secrete calcium phosphate, hydroxyapatite, phosphatases (such as alkaline phosphatase), metalloproteinases, all instrumental in proteolytic remodeling and mineralization of the surrounding matrix. The hypertrophic chondrocytes produce factors, such as VEGF, that initiate vascularization of the mineralized matrix that is then degraded by invading phagocytic chondroclasts and osteoclasts constituting the invading zone.

The developmental processes involving chondrogenesis are regulated by an interplay of a large number of systemic hormones and paracrine factors, including growth factors, cytokines and transcription factors. Table 8 lists key factors involved in chondrocyte proliferation and differentiation in the growth plate. (Brochhausen et al., J. Tissue Eng. Regen. Med. 2009, 3: 416-429).

Table 8. Summary of Key Factors involved in Chondrocyte Proliferation and Differentiation in the Growth Plate

Name	Class	Expression	Effect
ATF-2	Transcription factor	Resting chondrocytes; proliferative chondrocytes	Apoptosis
Bcl-2	Inner mitochondrial membrane protein	Proliferative chondrocytes; prehypertrophic chondrocytes	Apoptosis
Ihh	Signaling molecule	Prehypertrophic chondrocytes	Proliferation
PTHrP	Peptide hormone	Perichondrium perarticular chondrocytes	Proliferation
BMP	TGF-β superfamily growth factors	Prehypertrophic chondrocytes	Cartilage formation; proliferation
PGE_2	Lipid mediator	All zones of growth plate	Proliferation matrix synthesis
MMP	Metalloproteinase	Hypertrophic chondrocytes; chondroclasts	Apoptosis; vascularization matrix degradation
Sox	Transcription factor	Resting and proliferative chondrocytes; hypertrophic chondrocytes	Differentiation; proliferation;
Runx 2 (Cbfa 1)	Transcription factor	Hypertrophic chondrocytes	Terminal differentiation; matrix mineralization
NOTCH	Single pass transmembrane protein	Prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes	Inhibits terminal differentiation
HOX	Homeobox transcription factors	Hypertrophic chondrocytes	Activates osteogenic genes
FGF	Fibroblast growth factor	Proliferative chondrocytes	Antiproliferation

Stem Cells of Cartilaginous Tissue Compartments

Multipotent mesenchymal progenitor cells with adipogenic, osteogenic and chondrogenic potential, and that are CD105+/CD166+ (corresponding to TGF-β type III receptor (endoglin) and ALCAM, respectively), have been identified in articular cartilage. (Asalameh et al., Arthritis & Rheumatism, 2004, 50(5): 1522-1532). The presence of CD34-/CD45-/CD44+/CD73+/CD90+ mesenchymal stem cells with adipogenic, chondrogenic and osteogenic potential also has been shown. (Peng et al., Stem Cells and Development (2008), 17: 761-774). Similar to bone-derived MSCs, articular-derived MSCs are positive for surface expression of Notch-1. (Hiraoka et al., Biorheology, 2006, 43: 447-454). A potential MSC niche positive for Stro-1, Jagged-1 and BMPr1a has also been identified in the perichondrial zone of Ranvier on the growth plate. (Karlsson et al., 2009, J. Anat. 215(3): 355-63).

Differential expression of Notch-1, Stro-1 and VCAM-1/CD106 markers has been observed in normal articular cartilage versus osteoarthritic (OA) cartilage. In normal cartilage, expression of these markers is higher in the superficial zone (SZ) as compared to the middle zone (MZ) and deep zone (DZ). On the other hand, OA cartilage SZ has reduced Notch-1 and Sox-9 while MZ has increased Notch-1, Stro-1 and VCAM-1 positive cells. (Grogan et al., Arthritis Res. Ther. 2009, 11(3): R85-R97).

Intervertebral Disc Fibrocartilage Tissue Compartments

The intervertebral discs (IVD) predominantly are comprised of fibrocartilage. The IVD fibrocartilage is continuous both with and below the articular cartilage of adjacent vertebrae as well as peripherally with spinal ligaments. The IVD is a unique structure containing annulus fibrosus (AF) and nucleus pulposus (NP), a gelatinous ellipsoidal remnant of the embryonic notochord, and is sandwiched between two adjacent cartilaginous endplates (EP). IVD rupture and herniation of the nucleus pulposus into the spinal cord may cause severe pain and other neurological symptoms. The NP and AF synergistically function to achieve the primary role of IVD in transferring load, dissipating energy and facilitating in joint mobility.

The adult IVD is essentially avascular; hence, endogenous cells survive in a low-nutrient and low-oxygen microenvironment. The major ECM components of IVD include but are not limited to aggrecan, collagen (e.g., types I, II and IX), leucine rich repeat (LRR) proteins and proteoglycans (e.g., fibromodulin, decorin, lumican), cartilage oligomatrix protein, and collagen VI beaded filament network. (Feng et al., 2006, J. Bone Joint Surg. Am. 88: 25-29). The water content, GAG content, aggrecan levels and levels of type II collagen are significantly lower in older discs demonstrating the effects of IVD degeneration with age. (Murakami et al., 2010, Med. Biol. Eng. Comput. 48: 469-474).

The central nucleus pulposus (NP) is rich in aggrecan and hyaluron. The developing NP is characterized by the presence of highly vacuolated chondrocytes and small chondroblasts inherited from the notochord. Primarily functioning as a primitive axial support, the integrity of the notochord is maintained by a proteoglycan (PG-) and laminin-rich sheath. As NP matures, the cellular composition becomes predominantly chondrocytic. Mature NP cells are small and have an aggrecan rich matrix, which is essential in maintaining requisite hydration levels for mechanical function. Their gene expression profile and metabolic activity are distinct from the chondrocytes of articular cartilage. The ECM of immature NP has high aggrecan levels and primarily contains type II collagen, with the type IIA isoform expressed by progenitor cells during chondrogenesis, not by mature chondrocytes. (Hsieh A.H. and Twomey J.D., J. Biomech., 2010, 43(1): 137-156).

The AF surrounds the NP with layers of unidirectional sheets of collagen parallel to the circumference of a disc to form collagen lamellae. Alternating bidirectional collagen fibers intersperse the AF collagen lamellae. AF can be subdivided into three regions: inner AF, middle AF and outer AF. The inner AF arises along with endochondral formation of the vertebrae. The outer AF arises as a separate cell condensation with slower matrix formation. Lamellae of inner AF comprises predominantly of type II collagen and fibrochondrocytes, while those of outer AF are comprised of type I collagen and fibroblasts. A population of pancake shaped interlamellar cells as well as elastin fibers are also found within the lamellae, in vertebral

attachments, and at the NP-AF interface. Large proteoglycans (PGs; for example aggrecan and versican) and type I and VI collagen permeate interlamellar and translamellar ECM. (Hsieh A.H. and Twomey J.D., J. Biomech., 2010, 43(1): 137-156).

A large number of coordinated signals originating from the cells of the notochord and floor plate of the embryonal neural tube are instrumental in disc embryogenesis. Key signals include, but are not limited to, sonic hedgehog (Shh), Wnt, noggin, Pax family of transcription factors (e.g., *Pax 1* and *Pax 9*), Sox family of transcription factors (*Sox5, Sox6* and *Sox*) and TGF-β. (Smith et al., 2011, Dis Model Mech. 4(1): 31-41). Herniation and IVD degeneration are associated with changes in inflammatory and immune cytokine profiles, including, but not limited to, the activation of Th1-related cytokines (e.g. IFNγ) as well as Th17-related cytokines (e.g., IL-4, IL-6, IL-12 and IL-17). (Shamji et al., 2010, Arthritis & Rheumatism, 62(7): 1974-1982).

A potential stem cell niche comprised of progenitor cells that are positive for Notch1, Delta4, Jagged1, CD117, Stro-1 and Ki67 has been identified in intervertebral discs of a number of animals, including humans. It has been reported that the IVD tissue compartments comprise a slow growing zone in the AF as well as the NP regions. (Henriksson et al., 2009, SPINE, 34(21): 2278-2287).

2.4. Dental Tissue Compartments

A tooth has three anatomical divisions (crown, root and neck), and four structural components (enamel, dentin, cementum and pulp).

Enamel is the hardest, most mineralized biological tissue in the human body. It is composed of elongated hydroxyapatite crystallites bundled into rods or prisms, interspersed with crystalline interrods filling the interstitial space. Enamel cells, known as ameloblasts, are responsible for enamel development. Ameloblastin, TRAP and enamelin are key proteins found in enamel tissue whereas the enamel matrix is devoid of collagen, composed primarily of amelogenin. An intricate orchestration of signaling factors, such as BMPs (e.g., BMP-2, BMP-4, BMP-7), FGFs (e.g., FGF-3, -4, -9, -20), Wnt-3, 10a, 10b and transcription factors, such as, p21, Msx2 and Lef1 is responsible

for morphogenesis of enamel. Self-assembly of amelogens to form amelogenin nanospheres play a role in nucleation of hydroxyapatite crystallization and enamel mineralization. Matrix processing enzymes, such as MMP-20, kallikrein-4 (KLK4), also known as enamel matrix serine protease -1 (EMSP-1), are involved in the complete elimination of the protein matrix and replacement with a mineralized matrix. (Fong et al., 2005, J. Dent. Educ., 69(5): 555-570). Ameloblasts arise from epithelial stem cells of ectodermal origin. They are lost after tooth eruption leaving no adult human ectodermal stem cells in the mature enamel. In contrast, rodent enamel retain a niche of epithelial stem cells, known as apical bud cells, for continuous enamel production. (Ulmer et al., 2010, Schweiz Monatsschr Zahnmed, 120:860-872).

Dentin is a hard, yellowish and elastic living connective tissue compartment with biomechanical properties similar to bone. The formation of dentin is driven by mesenchymally derived mature odontoblasts that are fully differentiated and nondividing and that form a single layer underneath the dentin in a mature tooth. A series of epithelial-mesenchymal interactions regulates odontoblast differentiation from neural crest cells in the first branchial arch and frontonasal processes. Mature dentin is comprised of a mantle, composed of intertubular and peritubular dentin made of a collagen fibril matrix, with odontoblast cell processes extending into dentin tubules. During dentinogenesis, odontoblasts secrete predentin, a mineralized tissue composed of type I collagen. Unlike osteogenesis, in dentinogenesis, as the predentin layer is formed, the odontoblasts recede instead of becoming embedded within the dentin matrix, leaving behind cells processes within dentinal tubules. Subsequently, the unmineralized predentin is converted to dentin by gradual mineralization of collagen. Dentinogenesis is directed by a series of highly controlled biochemical events that control the rates of collagen secretion, its maturation into thick fibrils, loss of proteoglycans, mineral formation including hydroxy apatite crystallization, and growth. The dentin matrix is primarily composed of collagens (e.g., types I, III and V) as well as other matrix proteins, including, but not limited to, phosphorylated and nonphosphorylated matrix proteins, proteoglycans, growth factors, metalloproteinases, alkaline phosphatase serum derived proteins, and phospholipids. (Fong et al., 2005, J. Dent. Educ., 69(5): 555-570). No stem cells have been identified in mature dentin.

The dental pulp is the tooth's living tissue that responds to pain and damage and initiates tissue repair. An odontoblast cell layer forms the outer boundary of the pulp and is associated with an underlying network of dendritic cells. A cell-free zone underlying the odontoblast layer is rich in nerve fibers and blood vessels. Similar to dentin, dental pulp also differentiates from neural crest-derived ectomesenchyme during tooth development.

Several sources of stem cells have been identified associated with pulp tissue. In immature teeth, apical papilla, the embryonal organ responsible for pulp differentiation, is the source for stem cells of apical papilla (SCAP). Mature dental pulp is the source of dental pulp stem cells (DPSC) whereas stem cells are also extracted from exfoliated deciduous teeth (SHED). Additional cells of the dental pulp core that function in pulpal defense, include, but are not limited to, macrophages, lymphocytes and mast cells. Pulp matrix is composed of collagens (e.g., types I, III, V and VI), but lacks mineralization. Other noncollagenous proteins of the pulp matrix are similar in composition to dentin. The dental pulp is capable of responding to dentin tissue damage by secreting new dentin from old odontoblast populations or generation and secretion of dentin from new secondary odontoblast populations. (Fong et al., 2005, J. Dent. Educ., 69(5): 555-570).

The periodontium consists of tissues supporting the tooth crown, including a nonmineralized periodontal ligament (PDL) sandwiched between layers of mineralized tissues, including the cementum, alveolar bone and dentin. Cementum is a thin mineralized layer covering the dentin. Cementoblasts are cells responsible for cementum matrix secretion and subsequent mineralization. When cementoblasts become entrapped within cementum matrix, they are termed cementocytes. Cementoblasts are ectomesenchymal, being derived from neural crest cells, similar to PDL and alveolar bone. Like bone and dentin, cementum is a collagenous mineralized tissue that hardens upon formation of carbonated hydroxyapatite. (Fong et al., 2005, J. Dent. Educ., 69(5): 555-570).

PDL is a space between cementum and alveolar bone. It represents a replacement of the dental follicle region in immature developing teeth. Mature PDL contains mostly periodontal fibroblasts as well as stem cells, known as the periodontal ligament stem cells (PDLSCs). The immature dental follicle is also a source of mesenchymal stem cells, known as dental follicle stem cells (DFSCs). (Fong et al., 2005, J. Dent. Educ., 69(5): 555-570).

Table 9 shows the differentiation potential of dental mesenchymal cells. (Ulmer et al., 2010, Schweiz Monatsschr Zahnmed, 120:860-872).

Table 9. Differentiation Potential Dental Mesenchymal Stem Cells

	DPSC	SHED	PDLSC	DFSC	SCAP
Adipocytes	X	X	X	X	
Cementoblasts			X	X	
Chondrocytes	X		X		
Dental pulp	X				
Dentin	X				
Endothelocytes	X	X			
Musculature	X				
Neuroblasts				X	
Neurons	X	X			
Odontoblasts	X	X	X		X
Osteoblasts	X	X	X	X	X
PDL Progenitors				X	
Periodontium			X		

Several dental stem cell markers have been identified. Stro-1 and Stro-4 are commonly used dental stem cell markers for all dental mesenchymal stem cells. Dental stem cells originating from the neural crest have the neural marker, nestin. An osteoblast marker, osteocalcin, is also used as a stem cell marker for DPSCs. Similarly, SCAPs express Oct-4, Nanog, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 and TRA-1-81. (Ulmer et al., 2010, Schweiz Monatsschr Zahnmed, 120:860-872).

2.5. Fascial Tissue Compartment

Fascial tissue compartments form a layer of fibrous tissue found throughout the body surrounding softer and more delicate organs, including but not limited to muscles, groups of muscles, blood vessels, nerves, etc. Fascial tissue originates from the embryonic mesenchyme. Fasciae form during the development of bones, muscles and vessels from the mesodermal layer of the embryo. Fascial tissue can be categorized into three types depending on location: (1) superficial fascial tissue, which is found beneath the integument throughout the body, usually blending with the reticular layer of the dermis; (2) deep fascial tissue comprising dense fibroareolar connective tissue surrounding muscles, bones, nerves and blood vessels; and (3) visceral or subserous fascia, which suspends organs within their cavities and wraps them in layers of connective tissue membranes. (Chapter IV. Myology, Section 3. Tendons, Aponeuroses, and Fasciae, Gray's Anatomy of the Human Body, 20th Edition, Re-edited by Lewis, W.H., Lea & Febiger, Philadelphia, 1918, Bartleby.com, New York, 2000).

The fibroareolar connective tissue of fascia comprises four kinds of cells: (1) flattened lamellar cells, which may be branched or unbranched (branched lamellar cells contain clear cytoplasm and oval nuclei and project multidirectional processes that may unite to form an open network, such as in the cornea; unbranched lamellar cells are joined end to end. (2) Clasmatocytes, which are large irregular vacuolated or granulated cells with oval nuclei. (3) Granule cells, which are ovoid or spherical in shape. (4) Plasma cells of Waldeyer, usually spheroidal, characterized by vacuolated protoplasm.

2.6. Ligament Tissue Compartment

The term "ligaments" as used herein refers to dense regular connective tissue comprising attenuated collagenous fibers that connect bones at joints. Ligament ECM is composed of type I and type III collagens together with other proteoglycans and glycoproteins. Mesenchymal stem cells have been found in the human anterior cruciate ligament that exhibit multilineage differentiation potential, like bone-derived mesenchymal stem cells. (Cheng et al., 2010, Tissue Engg. A, 16(7):2237-2253).

2.7. Synovial Tissue Compartment

The synovial membrane is composed of fibrous connective tissue and lines the joint cavity of synovial joints. It is made up of a layer of macrophage (type A) and fibroblast-like (type B) synoviocytes and a loose sublining tissue. Synovial fluid is secreted by synovial cells lining the synovial membrane in the joint capsule. It is a viscid, mucoalbuminous fluid, rich in hyaluronic acid. It acts as a lubricating fluid, facilitating the smooth gliding of the articular surface. Functional mesenchymal stem cell niches have been identified as resident to synovial lining and subsynovial tissue. These cells are positive for the artificial nucleoside, iododeoxyuridine (IdU) as well as MSC markers such as PDGFRα, p75 and CD44 and have chondrogenic potential. (Kurth et al., Arthritis Rheum., 2011, 63(5): 1289-1300). Synovial fluid-derived MSCs have also been identified, and these have higher chondrogenic potential as compared to bone marrow-derived and adipogenic MSCs. (Koga et al., 2008, Cell Tissue Res., 333: 207-215). Synovial MSCs and MPCs have been shown to prevent degeneration due to intervertebral disc disease (IVD) and to be useful for cartilage tissue engineering. (Miyamoto et al., 2010, Arthritis Res. Ther., 12: R206-218; Lee et al., 2010, Tissue Engg. A, 16(1): 317-325).

2.8. Tendon Tissue Compartment

Tendons are specialized connective tissue compartments that connect bone to muscle. Tendon cells are embedded amongst a parallel group of collagenous fibers that secrete a unique ECM containing collagens, large proteoglycans, and small leucine rich proteoglycans that function as lubricators and organizers of collagen fibril assembly. A unique tendon stem/progenitor cell (TSPC) niche has been identified amongst the parallel collagen fibrils surrounded by ECM. The TSPCs exhibit osteogenic and adipogenic potential. Biglycan and fibromodulin are key tendon ECM components that direct TSPC fate through BMP signaling. These TSPCs are positive for bone marrow derived stem cell markers such as Stro-1, CD146, CD90 and CD44 but not for CD18. TSPCs do not express hematopoietic markers, such as CD34, CD45 and CD117, or the endothelial marker CD106. (Bi et al., 2007, Nat. Med., 13(10): 1219-1227).

2.9. Vasculature Tissue Compartment

The vascular wall is made of three concentric zones with distinct cellular composition, all mesodermal in origin: the tunica intima, containing predominantly mature differentiated endothelial cells (EC), the tunica media, containing mature and differentiated smooth muscle cells, and the tunica adventitia, containing mature fibroblasts. (Tilki et al., 2009, Trends Mol. Med. 15(11): 501-509). Endothelial progenitor cells (EPCs), meaning cells that exhibit clonal expression, stemness characteristics, adherence to matrix molecules and an ability to differentiate into endothelial cells (ECs) have been implicated in the formation of new blood vessels through angiogenesis and postnatal vasculogenesis. EPCs have many characteristic cell surface markers, including, but not limited to, CD34, AC133, KDR (VEGFR-2), Tie-2 and ligand for UEA-1 lectin. (Tilki et al., 2009, Trends Mol. Med. 15(11): 501-509; Melero-Martin and Dudley, 2011, Stem Cells, 29: 163-168; Pascilli et al., 2008, Exp. Cell Res., 315: 901-914).

EPC niches have been identified in the bone-marrow, peripheral cord blood and vascular wall matrix. Bone-marrow derived and cord blood EPCs essentially may be proangiogenic hematopoietic progenitor cells (HPCs), circulating in the blood and committed to myeloid lineage. (Tilki et al., 2009, Trends Mol. Med. 15(11): 501-509). The vascular wall stem and progenitor cells (VW-EPCs) reside in distinct zones of the vessel wall within subendothelial space, known as avasculogenic zone, within the vascular adventitia, forming vascular wall-specific niches. Fetal and adult arterial and venous blood vessel walls have also been found to harbor resident niches for a variety of stem and progenitor cells, such as EPCs, smooth muscle progenitors, HSCs, MSCs, mesangial cells coexpressing myogenic and endothelial markers, neural stem cells (NSCs), etc. (Tilki et al., 2009, Trends Mol. Med. 15(11): 501-509). The VW-EPCs are CD34(+)VEGFR-2(+)Tie-2(+)CD31(-)CD144(-). Proliferating and differentiating VW-EPCs become CD144(+).

During embryogenesis, there is evidence of the existence of a hemangioblast (giving rise to endothelial and hematopoietic cells) and hemogenic endothelium,

originating from precursors resident in the vascular wall. However, whether adult VW also contains ancestral progenitor hemangioblasts giving rise to both VW-EPCs as well as VW-HSCs is not known. Vascular wall also contains resident pericyte-like cells in the subendothelial spaces. These pericyte-like cells serve as a cellular reservoir for VW-MSCs, which can differentiate into colonies with adipogenic, osteogenic and chondrogenic markers. (Tilki et al., 2009, Trends Mol. Med. 15(11): 501-509).

3. Cells of the Epithelial Tissue Compartment

3.1. Placental Tissue Matrix

The placenta is considered one of the most important sources of stem cells, and has been studied extensively. It fulfills two main desiderata of cell therapy: a source of a high as possible number of cells and the use of non-invasive methods for their harvesting. Their high immunological tolerance supports their use as an adequate source in cell therapy (Mihu, C. et al., 2008, Romanian Journal of Morphology and Embryology, 2008, 49(4):441-446).

The fetal adnexa is composed of the placenta, fetal membranes, and umbilical cord. The term placenta is discoid in shape with a diameter of 15-20 cm and a thickness of 2-3 cm. The fetal membranes, amnion and chorion, which enclose the fetus in the amniotic cavity, and the endometrial decidua extend from the margins of the chorionic disc. The chorionic plate is a multilayered structure that faces the amniotic cavity. It consists of two different structures: the amniotic membrane (composed of epithelium, compact layer, amniotic mesoderm, and spongy layer) and the chorion (composed of mesenchyme and a region of extravillous proliferating trophoblast cells interposed in varying amounts of Langhans fibrinoid, either covered or not by syncytiotrophoblast).

Villi originate from the chorionic plate and anchor the placenta through the trophoblast of the basal plate and maternal endometrium. From the maternal side, protrusions of the basal plate within the chorionic villi produce the placental septa, which divide the parenchyma into irregular cotyledons (Parolini, O. et al., 2008, Stem Cell, 2008, 26:300-311).

Some villi anchor the placenta to the basal plate, whereas others terminate freely in the intervillous space. Chorionic villi present with different functions and structure. In the term placenta, the stem villi show an inner core of fetal vessels with a distinct muscular wall and connective tissue consisting of fibroblasts, myofibroblasts, and dispersed tissue macrophages (Hofbauer cells). Mature intermediate villi and term villi are composed of capillary vessels and thin mesenchyme. A basement membrane separates the stromal core from an uninterrupted multinucleated layer, called the syncytiotrophoblast. Between the syncytiotrophoblast and its basement membrane are single or aggregated Langhans cytotrophoblastic cells, commonly called cytotrophoblast cells (Parolini, O. et al., 2008, Stem Cell, 2008, 26:300-311).

Four regions of fetal placenta can be distinguished: an amniotic epithelial region, an amniotic mesenchymal region, a chorionic mesenchymal region, and a chorionic trophoblastic region.

Amniotic Membrane

Fetal membranes continue from the edge of the placenta and enclose the amniotic fluid and the fetus. The amnion is a thin, avascular membrane composed of an inner epithelial layer and an outer layer of connective tissue that , and is contiguous, over the umbilical cord, with the fetal skin. The amniotic epithelium (AE) is an uninterrupted, single layer of flat, cuboidal and columnar epithelial cells in contact with amniotic fluid. It is attached to a distinct basal lamina that is, in turn, connected to the amniotic mesoderm (AM). In the amniotic mesoderm closest to the epithelium, an acellular compact layer is distinguishable, composed of collagens I and III and fibronectin. Deeper in the AM, a network of dispersed fibroblast-like mesenchymal cells and rare macrophages are observed. It has been reported that the mesenchymal layer of amnion indeed contains two subfractions, one having a mesenchymal phenotype, also known as amniotic mesenchymal stromal cells, and the second containing monocyte-like cells.

Chorionic Membrane

A spongy layer of loosely arranged collagen fibers separates the amniotic and chorionic mesoderm. The chorionic membrane (chorion laeve) consists of mesodermal and trophoblastic regions. Chorionic and amniotic mesoderm are similar in composition. A large and incomplete basal lamina separates the chorionic mesoderm from the extravillous trophoblast cells. The latter, similar to trophoblast cells present in the basal plate, are dispersed within the fibrinoid layer and express immunohistochemical markers of proliferation. The Langhans fibrinoid layer usually increases during pregnancy and is composed of two different types of fibrinoid: a matrix type on the inner side (more compact) and a fibrin type on the outer side (more reticulate). At the edge of the placenta and in the basal plate, the trophoblast interdigitates extensively with the decidua (Cunningham, F. et al., The placenta and fetal membranes, Williams Obstetrics, 20th ed. Appleton and Lange, 1997, 95-125; Benirschke, K. and Kaufmann, P. Pathology of the human placenta. New York, Springer-Verlag, 2000, 42-46, 116, 281-297).

Amnion-Derived Stem Cells

The amniotic membrane itself contains multipotent cells that are able to differentiate in the various layers. Studies have reported their potential in neural and glial cells, cardiac repair and also hepatocyte cells. Studies have shown that human amniotic epithelial cells express stem cell markers and have the ability to differentiate toward all three germ layers. These properties, the ease of isolation of the cells, and the availability of placenta, make amnionic membrane a useful and noncontroversial source of cells for transplantation and regenerative medicine.

Amniotic epithelial cells can be isolated from the amniotic membrane by several methods that are known in the art. According to one such method, the aminiotic membrane is stripped from the underlying chorion and digested with trypsin or other digestive enzymes. The isolated cells readily attach to plastic or basement membrane-coated culture dishes. Culture is established commonly in a simple medium such as Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 5%-10% serum and

epidermal growth factor (EGF), in which the cells proliferate robustly and display typical cuboidal epithelial morphology. Normally, 2-6 passages are possible before proliferation ceases. Amniotic epithelial cells do not proliferate well at low densities.

Amniotic membrane contains epithelial cells with different surface markers, suggesting some heterogeneity of phenotype. Immediately after isolation, human amniotic epithelial cells express very low levels of human leukocyte antigen (HLA)-A, B, C; however, by passage 2, significant levels are observed. Additional cell surface antigens on human amniotic epithelial cells include, but are not limited to, ATP-binding cassette transporter G2 (ABCG2/BCRP), CD9, CD24, E-cadherin, integrins α6 and β1, c-met (hepatocyte growth factor receptor), stage-specific embryonic antigens (SSEAs) 3 and 4, and tumor rejection antigens 1-60 and 1-81. Surface markers thought to be absent on human amniotic epithelial cells include SSEA-1, CD34, and CD133, whereas other markers, such as CD117 (c-kit) and CCR4 (CC chemokine receptor), are either negative or may be expressed on some cells at very low levels. Although initial cell isolates express very low levels of CD90 (Thy-1), the expression of this antigen increases rapidly in culture (Miki, T. et al., Stem Cells, 2005, 23: 1549-1559; Miki, T. et al., Stem Cells, 2006, 2: 133-142).

In addition to surface markers, human amniotic epithelial cells express molecular markers of pluripotent stem cells, including octamer-binding protein 4 (OCT-4) SRY-related HMG-box gene 2 (SOX-2), and Nanog (Miki, T. et al., Stem Cells, 2005, 23: 1549-1559). Previous studies also have shown that human amnion cells in xenogeneic, chimeric aggregates, which contain mouse embryonic stem cells, can differentiate into all three germ layers and that cultured human amniotic epithelial cells express neural and glial markers, and can synthesize and release acetylcholine, catecholamines, and dopamine. Hepatic differentiation of human amniotic epithelial cells also has been reported. Studies have reported that cultured human amniotic epithelial cells produce albumin and α-fetroprotein and that albumin and α-fetroprotein-positive hepatocyte-like cells could be identified integrated into hepatic parenchyma following transplantation of human amniotic epithelial cells into the livers of severe combined inmmunodeficiency (SCID) mice. The hepatic potential of human amniotic epithelial cells was confirmed

and extended, whereby in addition to albumin and α-fetroprotein production, other hepatic functions, such as glycogen storage and expression of liver-enriched transcription factors, such as hepatocyte nuclear factor (HNF) 3γ and HNF4α, CCAAT/enhancer-binding protein (CEBP α and β), and several of the drug metabolizing genes (cytochrome P450) were demonstrated. The wide range of hepatic genes and functions identified in human amniotic epithelial cells has suggested that these cells may be useful for liver-directed cell therapy (Parolini, O. et al., 2008, Stem Cell, 2008, 26:300-311).

Differentiation of human amniotic epithelial cells to another endodermal tissue, pancreas, also has been reported. For example, it was shown that human amniotic epithelial cells cultured for 2-4 weeks in the presence of nicotinamide to induce pancreatic differentiation, expressed insulin. Subsequent transplantation of the insulin-expressing human amniotic epithelial cells corrected the hyperglycemia of streptozotocin-induced diabetic mice. In the same setting, human amniotic mesenchymal stromal cells were ineffective, suggesting that human amniotic epithelial cells, but not human amniotic mesenchymal stromal cells, were capable of acquiring β-cell fate (Parolini, O. et al., 2008, Stem Cell, 2008, 26:300-311).

Mesenchymal Stromal Cells from Amnion and Chorion: hAMSC and hCMSC

Human amniotic mesenchymal cells (hAMSC) and human chorionic mesenchymal cells (hCMSC) are thought to be derived from extraembryonic mesoderm. hAMSC and hCMSC can be isolated from first-, second-, and third-trimester mesoderm of amnion and chorion, respectively. For hAMSC, isolations are usually performed with term amnion dissected from the deflected part of the fetal membranes to minimize the presence of maternal cells. For example, homogenous hAMSC populations can be obtained by a two-step procedure, whereby: minced amnion tissue is treated with trypsin to remove hAEC and the remaining mesenchymal cells are then released by digestion (e.g., with collagenase or collagenase and DNase). The yield from term

amnion is about 1 million hAMSC and 10-fold more hAEC per gram of tissue (Casey, M. and MacDonald P., Biol Reprod, 1996, 55: 1253-1260).

hCMSCs are isolated from both first- and third-trimester chorion after mechanical and enzymatic removal of the trophoblastic layer with dispase. Chorionic mesodermal tissue is then digested (e.g., with collagenase or collagenase plus DNase). Mesenchymal cells also have been isolated from chorionic fetal villi through explant culture, although maternal contamination is more likely (Zhang, X., et al., Biochem Biophys Res Commun, 2006, 340: 944-952; Soncini, M. et al., J Tissue Eng Regen Med, 2007, 1:296-305; Zhang et al., Biochem Biophys Res Commun, 2006, 351: 853-859).

The surface marker profile of cultured hAMSC and hCMSC, and mesenchymal stromal cells (MSC) from adult bone marrow are similar. All express typical mesenchymal markers (Table 7) but are negative for hematopoietic (CD34 and CD45) and monocytic markers (CD14). Surface expression of SSEA-3 and SSEA-4 and RNA for OCT-4 has been reported (Wei J. et al., Cell Transplant, 2003, 12: 545-552; Wolbank, S. et al., Tissue Eng, 2007, 13: 1173-1183; Alviano, F. et al., BMC Dev Biol, 2007, 7: 11; Zhao, P. et al, Transplantation, 2005, 79: 528-535). Both first- and third trimester hAMSC and hCMSC express low levels of HLA-A, B, C but not HLA-DR, indicating an immunoprivileged status (Portmann-Lanz, C. et al, Am J Obstet Gynecol, 2006, 194: 664-673; Wolbank, S. et al., Tissue Eng, 2007, 13: 1173-1183).

Table 10 provides surface antigen expression profile at passages 2-4 for amniotic mesenchymal stromal and human chorionic mesenchymal stromal stem cells.

Table 10. Specific surface antigen expression for aminiotic mesenchymal stromal cells and human chorionic mesenchymal stromal cells

Positive (≥ 95%)	Negative (≤ 2%)
CD90	CD45
CD73	CD34
CD105	HLA-DR

Both hAMSCs and hCMSCs differentiate toward "classic" mesodermal lineages (osteogenic, chondrogenic, and adipogenic) and differentiation of hAMSC to all three germ layers-ectoderm (neural), mesoderm (skeletal muscle, cardiomyocytic and endothelial), and endoderm (pancreatic) was reported (Int'Anker, P. et al., Stem Cells, 2004, 22: 1338-1345; Portmann-Lanz, C. et al, Am J Obstet Gynecol, 2006, 194: 664-673; Wolbank, S. et al., Tissue Eng, 2007, 13: 1173-1183; Soncini, M. et al., J Tissue Eng Regen Med, 2007, 1:296-305; Alviano, F., BMC Dev Biol, 2007, 7: 11).

Human amniotic and chorionic cells successfully and persistently engraft in multiple organs and tissues in vivo. Human chimerism detection in brain, lung, bone marrow, thymus, spleen, kidney, and liver after either intraperitoneal or intravenous transplantation of human amnion and chorion cells into neonatal swine and rats was indeed indicative of an active migration consistent with the expression of adhesion and migration molecules (L-selectin, VLA-5, CD29, and P-selectin ligand 1), as well as cellular matrix proteinase (MMP-2 and MMP-9) (Bailo, M. et al., Transplantation, 2004, 78:1439-1448).

Umbilical Cord

Two types of umbilical stem cells can be found, namely hematopoietic stem cells (UC–HS) and mesenchymal stem cells, which in turn can be found in umbilical cord blood (UC–MS) or in Wharton's jelly (UC–MM). The blood of the umbilical cord has long been in the focus of attention of researchers as an important source of stem cells for transplantation, for several reasons: (1) it contains a higher number of primitive hematopoietic stem cells (HSC) per volume unit, which proliferate more rapidly, than bone marrow; (2) there is a lower risk of rejection after transplantation; (3) transplantation does not require a perfect HLA antigen match (unlike in the case of bone marrow); (4) UC blood has already been successfully used in the treatment of inborn metabolic errors; and (5) there is no need for a new technology for collection and storage of the mononuclear cells from UC blood, since such methods are long established.

Umbilical cord (UC) vessels and the surrounding mesenchyma (including the connective tissue known as Wharton's jelly) derive from the embryonic and/or extraembryonic mesodermis. Thus, these tissues, as well as the primitive germ cells, are differentiated from the proximal epiblast, at the time of formation of the primitive line of the embryo, containing MSC and even some cells with pluripotent potential. The UC matrix material is speculated to be derived from a primitive mesenchyma, which is in a transition state towards the adult bone marrow mesenchyma (Mihu, C. et al., 2008, Romanian Journal of Morphology and Embryology, 2008, 49(4):441-446).

The blood from the placenta and the umbilical cord is relatively easy to collect in usual blood donation bags, which contain anticoagulant substances. Mononuclear cells are separated by centrifugation on Ficoll gradient, from which the two stem cell populations will be separated: (1) hematopoietic stem cells (HSC), which express certain characteristic markers (CD34, CD133); and (2) mesenchymal stem cells (MSC) that adhere to the culture surface under certain conditions (e.g., modified McCoy medium and lining of vessels with Fetal Bovine Serum (FBS) or Fetal Calf Serum (FCS)). (Munn, D. et al., Science, 1998, 281: 1191-1193; Munn, D. et al., J Exp Med, 1999, 189: 1363-1372). Umbilical cord blood MSCs (UC–MS) can produce cytokines, which facilitate grafting in the donor and in vitro HSC survival compared to bone marrow MSC. (Zhang, X et al., Biochem Biophys Res Commun, 2006, 351: 853-859).

MSCs from the umbilical cord matrix (UC–MM) are obtained by different culture methods depending on the source of cells, e.g., MSCs from the connective matrix, from subendothelial cells from the umbilical vein or even from whole umbilical cord explant. They are generally well cultured in DMEM medium, supplemented with various nutritional and growth factors; in certain cases prior treatment of vessels with hyaluronic acid has proved beneficial (Baban, B. et al., J Reprod Immunol, 2004, 61: 67-77).

3.2. Lung

The lungs, which are paired organs that fill up the thoracic cavity, constitute an efficient air-blood gaseous exchange mechanism, accomplished by the passage of air from the mouth or nose, sequentially through an oropharynx, nasopharynx, a larynx, a

trachea and finally through a progressively subdividing system of bronchi and bronchioles until it finally reaches alveoli where the air-blood gaseous exchange takes place. A resident niche with characteristic multipotent stem cells with c-kit positive surface profiles recently has been identified localized in small bronchioles alveoli. These stem cells express the transcription factors, Nanog, Oct3/4, Sox2 and Klf4, that govern pluripotency in embryonic stem cells. (Kajstura, J. et al., 2011, New Engl. J. Med., 364(19):1795-1806)).

3.3. Mammary

The mammary gland is a hormone sensitive bilayered epithelial organ comprising an inner luminal epithelial layer and an outer myoepithelial layer surrounded by a basement membrane in a stromal fat pad. Mammary stem cells with myoepithelial potential have been identified in their niches in the terminal ducts of mammary gland. (LaBarge, 2007, Stem Cell Rev., 3(2): 137-146).

3.4. Skin

The skin functions as the primary barrier imparting protection from environmental insults. Skin is composed of an outer epidermis and inner dermis separated by a basement membrane (BM), rich in ECM and growth factors. The BM of the epidermal-dermal junction is composed of collagens (e.g., type IV and XVII), laminins, nidogen, fibronectin and proteoglycans that provide storage sites for growth factors and nutrients supporting the proliferation and adhesion of epidermal keratinocytes.

The epidermis is a solid epithelial tissue comprising keratinocytes that are linked to each other via cellular junctions, such as desmosomes. Keratinocytes are organized into distinct layers, comprising the stratum corneum, stratum granulosum, stratum spinosum and stratum basale. The epidermal matrix is made up of hyaluronan and other proteoglycans, including but not limited to, desmosealin, glycipans, versican, perlecan, and syndecans. (Sandjeu and Haftek, 2009, J. Physiol. Pharmacol. 60 (S4): 23-30). Epidermal desmosomes are multimeric complexes of transmembrane

glycoprotein and cytosolic proteins with the keratin cytoskeleton. Desmosal proteins of the epidermis predominantly belong to the cadherin, *Armadillo* and plakin superfamilies.

The underlying dermis is connective tissue comprised primarily of fibroblasts with occasional inflammatory cells. Embedded within the dermis are also epidermal appendages, such as hair follicles and sebaceous glands, as well as nerves and cutaneous vasculature. The dermal ECM is essentially made of type I, III and V collagens and elastin together with noncollagenous components such as glycoproteins, proteoglycans, GAGs, cytokines and growth factors. Dermal collagens help mediate fibroblast-matrix interactions through a number of cell surface receptors and proteoglycans, such as β1-integrins. (Hodde and Johnson, 2007, Am. J. Clin. Dermatol. 8(2): 61-66).

During embryonic development, the epidermis originates from the ectoderm, while the dermis differentiates from the mesoderm. Following gastrulation, as mesenchymal stem cells of mesodermal origin populate the skin, they send signals to the single epidermal layer for initiation of epidermal stratification and direct the positioning of outgrowths of epidermal appendages, such as the hair follicles and sebaceous glands. Along with the mesenchyme, the basal layer of the epidermis organizes into a basement membrane that is rich in ECM proteins and growth factors. A number of different signaling pathways have been implicated in skin morphogenesis, including but not limited to Notch, Wnt, mitogen activated protein kinase (MAPK), nuclear factor-κB (NF-κB), transcriptional regulator, p63, the AP2 family of transcription factors, CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) transcriptional regulators, interferon regulatory 6 (URF6), grainyhead-like 3 (GRHL3) and Kruppel-like factor (KLF4). (Blanpain and Fuchs, 2009, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 10(3): 207-217).

Adult skin undergoes constant cellular turnover whereby dead skin cells are shed and new cells are regenerated and replaced, by a process known as skin homeostasis. Several stem cell niches with distinct surface marker profiles and differentiation potentials have been identified. These include, but are not limited to, epidermal stem cells of interfollicular epidermis, bulge stem cells and epithelial stem cells of the hair

follicle, dermal stem cells (e.g., multipotent dermal cells, skin-derived progenitor cells, dermis-derived multipotent stem cells and fibrocytes), dermal papilla stem cells, and sebaceous gland stem cells. Collectively, these skin stem cell niches partake in maintaining skin homeostasis with the help of growth factors and cytokines. (Zouboulis et al., 2008, Exp. Gerontol. 43: 986-997; Blanpain, 2010, Nature, 464: 686-687).

4. Cells of the Muscular Tissue Compartment

The muscular tissue compartments are comprised of contractile muscle tissue. These can be of three kinds: skeletal muscle associated with the skeletal system; cardiac muscle associated with the heart; and smooth muscle associated with the vasculature and gastrointestinal tract. Skeletal muscle tissue fibers are striated and are voluntary in function. Cardiac muscle fibers have characteristic intercalated discs and are involuntary in function. Smooth muscle tissue is comprised of spindle shaped cells and is involuntary in function.

Skeletal muscles are composed of a population of quiescent myogenic precursor cells known as satellite cells with muscle regenerating and self-renewal properties, as well as a population of multipotent muscle-derived stem cells (MDSC) with multilineage differentiation potential, such as mesodermal lineages including, but not limited to, myogenic lineages, adipogenic lineages, osteogenic lineages, chondrogenic lineages, endothelial and hematopoetic lineages, and ectodermal lineages, including not limited to neuron-like cells. (Xu et al., 2010, Cell Tissue Res., 340: 549-567).

Skeletal muscle satellite cells are quiescent mononucleated cells that are resident in the muscle fiber membrane, beneath the basal lamina forming distinct stem cell niches. Similar to other stem cell niches, the skeletal muscle satellite cell niche is a dynamic structure, capable of altering between inactive (quiescent) and activated states in response to external signals. Once activated, satellite cells have the potential to proliferate, expand and differentiate along the myogenic lineage. The basal lamina, which serves to separate individual skeletal muscle fibers, known as myofibers, and their associated satellite cell and stem cell niches, from the cells of the interstitium, is rich in collagen type IV, perlecan, laminin, entactin, fibronectin and several other

glycoproteins and proteoglycans, that may function as receptors to growth factors effectuating their activation by extracellular processing and modifications. In addition to these interactions provided by the ECM, neighboring cells, such as endothelial cells and multipotent stem cells derived from blood vessels, such as pericytes and mesoangioblasts, or neural components, all have the potential of affecting the niche microenvironment. (Gopinath et al., 2008, Aging Cell, 7: 590-598).

Endogenous cardiac stem cells have also been identified in cardiac stem cell niches. (Mazhari and Hare, 2007, Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med., 4(S1): S21-S26).

Vascular smooth muscle cells are derived from embryonic cardiac neural crest stem cells, as well as proepicardial cells and endothelial progenitor cells. Smooth muscle differentiation is dependent on a combination of factors, including but not limited to Pax3, Tbx1, FoxC1 and serum response factor, interacting with microenvironment components of the ECM, such as BMPs, Wnts, endothelin (ET)-1, and FGF8. In the adult, vascular smooth muscle cells undergo constant degeneration, repair and regeneration by the concerted efforts of both multipotent bone-derived mesenchymal cells as well as smooth muscle stem cells resident within vascular smooth muscle tissue. (Hirschi and Majesky, 2004, The Anatomical Record, Part A, 276A: 22-33).

5. Cells of the Neural Tissue Compartment

The neural tissue compartments are comprised of neurons and the neuroglia, embedded with the neural matrix. Neural tissue is ectodermal in origin, derived from the embryonic neural plate. Neural tissue is primarily located within the brain, spinal cord and nerves.

Resident neural stem cell niches have been identified in the adult mammalian brain, restricted to the subventricular zone as well as to the lateral ventricle and dentate gyrus subgranular zone of the hippocampus. Astrocytes, which are star-shaped nerve cells, serve as both neural stem cells as well as supporting niche cells secreting essential growth factors that provide support for neurogenesis and vasculogenesis. The basal lamina and associated vasculogenesis are essential components of the niche. Embryonic molecular factors and signals persist within the neural stem cell niches and

play critical role in neurogenesis. Neural stem cells have VEGFR2, doublecortin and Lex (CD15) markers. Major signaling pathways implicated in neurogenesis include but are not limited to Notch, Eph/ephrins, Shh, and BMPs. (Alvarez-Buylla and Lim, 2004, Neuron, 41: 683-686).

6. Grafts - Grafts and Graft Rejection

A graft is a tissue or organ used for transplantation to a patient. A common strategy employed in tissue engineering involves the seeding of decellularized natural ECM or synthetic scaffolds with a variety of different stem or progenitor cells that are capable of regeneration (see, for example, Flynn and Woodhouse, 2008, Organogenesis, 4(4): 228-235; Uriel et al., 2008, Biomaterials, 29: 3712-3719; Flynn, 2010, Biomaterials, 31: 4715-4724; Choi et al., Tissue Engg. C., 16(3): 387-396; Brown et al., 2011, Tissue Engg. C., 17(4): 411-421; Cheng et al., 2009, Tissue Engg. A, 15(2): 231-241; Li et al., 2011, Biomaterials, doi:10:1016/j.biomaterials.2011.03.008; Butler et al., 2003, Connective Tissue Research, 44(S1): 171-178); Mercuri et al., J. Biomed. Mater. Res. A., 96(2): 422-435); Olson et al., 2011, Chonnam. Med. J. 47:1-13).

Transplanted grafts may be rejected by the recipient host via an orchestrated immune response against the histocompatibility antigens expressed by the grafted tissue, which the recipient host may see as foreign. Effectors primarily responsible for such rejections include type 1 helper CD4+ cells, cytotoxic CD8+ cells and antibodies. Alternative mechanisms of rejection include the involvement of type 2 helper CD4+ cells, memory CD8+ cells, and cells that belong to the innate immune system, such as natural killer cells, eosinophils, and neutrophils. In addition, local inflammation associated with rejection is tightly regulated at the graft level by regulatory T cells and mast cells.

Implants

Patients suffering from affected or injured organs may be treated with organ transplantation. However, current methods of organ transplantation are faced with challenges due, in part to the need to suppress immune rejection of the transplanted

organ. Most methods rely on the use of immunosuppressive drugs that are associated with unwanted side effects.

It is estimated that more than one million patients need to be treated surgically for skeletal afflictions every year due to bony defects created during tumor surgery or caused by trauma, congenital skeletal abnormalities, fracture, scoliosis, spinal arthrodesis, or joint and tooth replacement. Surgical treatments, however, are not always effective to address these problems because of inadequate local bone conditions and impaired bone healing. For example, complicated fractures may fail to heal, resulting in delayed unions (a bone fracture that is taking an exceptionally long amount of time to heal) or non-unions (absence of healing in a fracture). In addition, the treatment of bone tumors or congenital syndromes often requires the artificial creation of large bony defects, which need to be filled, demanding suitable and biocompatible substitutes for bone grafts.

Bone healing around implants involves the activation of a sequence of osteogenic, vascular, and immunological events that are similar to those occurring during bone healing. Various cell types, growth factors and cytokines are involved and interact throughout the stages of osteointegration, including inflammation, vascularization, bone formation, and ultimately bone remodeling.

Bone Grafts

Fresh autologous bone grafts for the treatment of an osseous defect or fracture in a patient are derived from bone marrow freshly harvested from the iliac crest (the thick curved upper border of the ilium, the most prominent bone on the pelvis) and combined with other materials including osteoconductive substrates. Complications associated with autologous harvest include donor site morbidity as high as 25%, infection, malformation, pain, and loss of function.

Bone Matrix with Mesenchymal Stem Cells

Attempts have been made to repair osseous defects by implanting a bone matrix comprising autologous or allogeneic mesenchymal stem cells (MSCs). MSCs are

considered immunologically neutral, meaning that the mesenchymal stem cells from the donor need not be tissue-matched to the recipient, thus allowing MSCs to be used effectively in allogeneic grafts. In addition, culture-expanded allogeneic MSCs have been implanted either directly or combined with a matrix, such as a gelatin-based or collagen-based matrix, or a bone matrix, in order to support differentiation of the MSCs in vivo.

In other instances, MSCs have been combined with a bone matrix from which bone marrow has been removed in order to remove undesirable cells, and the matrix then seeded with culture-expanded MSCs. Such compositions then are cryopreserved under standard cryopreservation procedures for later use. However, this method is not ideal for several reasons. First, because the MSCs have been removed from the original stem cell niche and seeded onto a new bone matrix, the MSCs in such a composition are not well-attached to the bone matrix and become merely suspended in the cryopreservation solution. As a result, many active cells can be lost during the process of removing the cryopreservation solution before transplantation into a subject. Secondly, since the cells are not attached to the stem cell niche or lacunae to which they were originally attached and in which they were nurtured, the expandability and osteogenic potential of the cells may be affected negatively by the separation and seeding procedures.

Tissue-derived implant materials replicate the biological and mechanical function of naturally occurring extracellular matrix found in body tissues. Such tissue-derived matrices provide the necessary support on which cells can adhere to, migrate and expand and allow the influx and efflux of cells, such as stem cells and progenitor cells, and other factors, such as growth factors and cytokines, capable of inducing and supporting growth and tissue repair.

GLOSSARY

The term “ambient temperature” as used herein refers to the temperature of the immediate, unaltered surroundings. Ambient temperature is between about 18°C and

about 28°C. According to some embodiments, ambient temperature is room temperature.

The term "adherent" as used herein refers to the act of sticking to, clinging, or staying attached.

The term "adipokine" as used herein refers to a factor secreted by adipose tissue.

The term "adipocyte" as used herein refers to the functional cell type of fat, or adipose tissue, that is found throughout the body, particularly under the skin. Adipocytes store and synthesize fat (more specifically, triglycerides or lipids) for energy, thermal regulation and cushioning against mechanical shock. Although the lineage of adipocytes is still unclear, it appears that MSCs can differentiate into two types of lipoblasts, one that give rise to white adipocytes and the other to brown adipocytes. Both types of adipocytes store triglycerides and other lipids.

The term "adipogenic" as used herein refers to a potential of undifferentiated precursor cells to differentiate into fat-forming or adipocompetent cells.

The term "adipose stem cell" or "adipose-derived stem cell" (ASC) as used herein refers to pluripotent stem cells, MSCs and more committed adipose progenitors and stroma obtained from adipose tissue.

The term "administer" as used herein means to give or to apply.

The term "allogeneic" as used herein refers to being genetically different although belonging to or obtained from the same species.

The term "amniotic stem cells" as used herein refers to pluripotent stem cells, multipotent stem cells and progenitor cells derived from amniotic membrane, which can give rise to a limited number of cell types in vitro and/or in vivo under an appropriate condition, and expressly includes both amniotic epithelial cells and amniotic stromal cells.

The term "attached" as used herein refers to being fastened, fixed, joined, connected, bound, adhered to or assembled with.

The term "autologous" as used herein means derived from the same organism.

The term "autologous graft" or "autograft" as used herein refers to a tissue that is grafted into a new position in or on the body of the same individual.

The term "basic fibroblast growth factor" (bFGF, FGF2) as used herein refers to a multifunctional effector for many cells of mesenchymal and neuroectodermal origin that is a potent inducer of neovascularization and angiogenesis.

The term "biocompatible" as used herein refers to causing no clinically relevant tissue irritation, injury, toxic reaction, or immunological reaction to living tissue.

The term "biomarkers" (or "biosignatures") as used herein refers to peptides, proteins, nucleic acids, antibodies, genes, metabolites, or any other substances used as indicators of a biologic state. It is a characteristic that is measured objectively and evaluated as a cellular or molecular indicator of normal biologic processes, pathogenic processes, or pharmacologic responses to a therapeutic intervention.

The term "bone" as used herein refers to a hard connective tissue consisting of cells embedded in a matrix of mineralized ground substance and collagen fibers. The fibers are impregnated with a form of calcium phosphate similar to hydroxyapatite as well as with substantial quantities of carbonate, citrate and magnesium. Bone consists of a dense outer layer of compact substance or cortical substance covered by the periosteum and an inner loose, spongy substance; the central portion of a long bone is filled with marrow.

The terms "cancellous bone" or "trabecular bone" as used herein refer to the spongy bone found in the inner parts of compact bone in which the matrix forms a lattice of large plates and rods known as the trabeculae, which anastomose to form a latticework. This latticework partially encloses many intercommunicating spaces filled with bone marrow. The marrow spaces are relatively large and irregularly arranged,

and the bone substance is in the form of slender anastomosing trabeculae and pointed spicules.

The terms “cortical bone” or “compact bone” as used herein refer to the dense outer layer of bone that consists largely of concentric lamellar osteons and interstitial lamellae. The spaces or channels are narrow and the bone substance is densely packed.

The term “bone morphogenetic protein (BMP) as used herein refers to a group of cytokines that are part of the transforming growth factor-ß (TGF-ß) superfamily. BMP ligands bind to a complex of the BMP receptor type II and a BMP receptor type I (Ia or Ib). This leads to the phosphorylation of the type I receptor that subsequently phosphorylates the BMP-specific Smads (Smad1, Smad5, and Smad8), allowing these receptor-associated Smads to form a complex with Smad4 and move into the nucleus where the Smad complex binds a DNA binding protein and acts as a transcriptional enhancer. BMPs have a significant role in bone and cartilage formation in vivo. It has been reported that most BMPs are able to stimulate osteogenesis in mature osteoblasts, while BMP-2, 6, and 9 may play an important role in inducing osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. Cheng, H. et al., J. Bone & Joint Surgery 85: 1544-52 (2003).

The term “bound” or any of its grammatical forms as used herein refers to the capacity to hold onto, attract, interact with or combine with.

The term "buffer" or “buffer solution” as used herein refers to a compound, usually a salt, which, when dissolved in an aqueous medium, serves to maintain the free hydrogen ion concentration of the solution within a certain pH range when hydrogen ions are added or removed from the solution. A salt or solution is said to have a "buffering capacity" or to buffer the solution over such a range, when it provides this function. Generally a buffer will have adequate buffering capacity over a range that is within .±.1 pH unit of its pK.

The term “buffered isotonic solution” as used herein refers to any buffer that is commonly used in biological research. Exemplary buffered isotonic solutions include but are not limited to balanced salt solution (BSS), Hank’s Balanced Salt Solution, Gey’s Balanced Salt Solution, Hank’s Buffered Salt Solution, Phosphate Buffered Saline, Tris-Buffered Saline, etc. The term “isotonic solution” as used herein refers to a solution whose osmolarity and ion concentrations closely match those within normal cells of the body and the blood.

The term “carrier” as used herein refer to a pharmaceutically acceptable inert agent or vehicle for delivering one or more active agents to a subject, and often is referred to as “excipient.” The carrier must be of sufficiently high purity and of sufficiently low toxicity to render it suitable for administration to the subject being treated. The carrier further should maintain the stability and bioavailability of an active agent

The term "cell" is used herein to refer to the structural and functional unit of living organisms and is the smallest unit of an organism classified as living.

The term "chemokine" as used herein refers to a class of chemotactic cytokines that signal leukocytes to move in a specific direction.

The terms "chemotaxis" or "chemotactic" refer to the directed motion of a motile cell or part along a chemical concentration gradient towards environmental conditions it deems attractive and/or away from surroundings it finds repellent.

The term “chondrocytes” as used herein refers to cells found in cartilage that produce and maintain the cartilaginous matrix for, for example, joints, ear canals, trachea, epiglottis, larynx, the discs between vertebrae and the ends of ribs. From least to terminally differentiated, the chondrocytic lineage is (i) Colony-forming unit-fibroblast (CFU-F); (ii) mesenchymal stem cell / marrow stromal cell (MSC); (iii) chondrocyte.

The term “chondrogenesis” as used herein refers to the formation of new cartilage from cartilage forming or chondrocompetent cells.

The term "chondrogenic" as used herein refers to a potential of undifferentiated precursor cells to differentiate into cartilage forming or chondrocompetent cells.

The term "compatible" as used herein means that the components of a composition are capable of being combined with each other in a manner such that there is no interaction that would substantially reduce the efficacy of the composition under ordinary use conditions.

The term "component" as used herein refers to a constituent part, element or ingredient.

The term "condition", as used herein, refers to a variety of health states and is meant to include disorders or diseases caused by any underlying mechanism or disorder, injury, and the promotion of healthy tissues and organs.

The term "contact" and its various grammatical forms as used herein refers to a state or condition of touching or of immediate or local proximity. Contacting a composition to a target destination may occur by any means of administration known to the skilled artisan.

The term "cut section thickness" as used herein refers to thickness of a section as measured directly from the sectioning device (cryostat, microtome, etc.) prior to histological processing, which may cause shrinkage in the z-axis. Also known as the block advance of the microtome.

The term "cytokine" as used herein refers to small soluble protein substances secreted by cells which have a variety of effects on other cells. Cytokines mediate many important physiological functions including growth, development, wound healing, and the immune response. They act by binding to their cell-specific receptors located in the cell membrane, which allows a distinct signal transduction cascade to start in the cell, which eventually will lead to biochemical and phenotypic changes in target cells. Generally, cytokines act locally. They include type I cytokines, which encompass many of the interleukins, as well as several hematopoietic growth factors; type II cytokines, including the interferons and interleukin-10; tumor necrosis factor ("TNF")-related

molecules, including TNFα and lymphotoxin; immunoglobulin super-family members, including interleukin 1 ("IL-1"); and the chemokines, a family of molecules that play a critical role in a wide variety of immune and inflammatory functions. The same cytokine can have different effects on a cell depending on the state of the cell. Cytokines often regulate the expression of, and trigger cascades of other cytokines. Nonlimiting examples of cytokines include e.g., IL-1.alpha., IL-.beta., IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12/IL-23 P40, IL13, IL-17, IL-18, TGF-beta., IFN-gamma., GM-CSF, Gro.alpha., MCP-1 and TNF-alpha.

The term "cytometry" as used herein refers to a process in which physical and/or chemical characteristics of single cells, or by extension, of other biological or nonbiological particles in roughly the same size or stage, are measured. In flow cytometry, the measurements are made as the cells or particles pass through the measuring apparatus (a flow cytometer) in a fluid stream. A cell sorter, or flow sorter, is a flow cytometer that uses electrical and/or mechanical means to divert and collect cells (or other small particles) with measured characteristics that fall within a user-selected range of values.

“Decellularization”, as used herein in all of its grammatical forms, is any process by which cells and cellular components (including DNA) are removed from a tissue, thereby leaving the extracellular matrix (ECM) essentially free of such cells and cellular components.

“Delipidization” and “delipidation”, as used herein in all of their grammatical forms, are any processes by which lipids are removed from a tissue, and are used interchangeably herein.

”Demineralized bone matrix” (DBM) refers to a bone-derived material that has osteoconductive and osteoinductive activity. DBM may be prepared by acid extraction of allograft bone, resulting in loss of most of the mineralized component but retention of collagen and noncollagenous proteins, including growth factors. Methods for preparing demineralized bone matrix from bone are known in the art, as disclosed, for example, in U.S. Pat. Nos. 5,073,373; 5,484,601; and 5,284,655, which are incorporated herein by

reference. DBM may be prepared from autologous bone, allogeneic (or "allograft") bone, or xenogeneic bone. DBM may be prepared from cancellous bone, cortical bone, or combinations of cancellous and cortical bone. For the purpose of the present disclosure, demineralized bone includes bone matrix having a residual mineral content of 5% or less (w/w), 2% or less (w/w), 1% or less (w/w), 0.5% or less (w/w), or consisting essentially of collagen, non-collagen proteins such as growth factors, and other nonmineral substances found in the original bone, although not necessarily in their original quantities. The term "demineralized cortical bone" (DCB) as used herein refers to a demineralized allograft cortical bone.

The term "derivative" as used herein means a compound that may be produced from another compound of similar structure in one or more steps. A "derivative" or "derivatives" of a peptide or a compound retains at least a degree of the desired function of the peptide or compound. Accordingly, an alternate term for "derivative" may be "functional derivative." Derivatives can include chemical modifications of the peptide, such as akylation, acylation, carbamylation, iodination or any modification that derivatizes the peptide. Such derivatized molecules include, for example, those molecules in which free amino groups have been derivatized to form amine hydrochlorides, p-toluene sulfonyl groups, carbobenzoxy groups, t-butyloxycarbonyl groups, chloroacetyl groups or formal groups. Free carboxyl groups can be derivatized to form salts, esters, amides, or hydrazides. Free hydroxyl groups can be derivatized to form O-acyl or O-alkyl derivatives. The imidazole nitrogen of histidine can be derivatized to form N-im-benzylhistidine. Also included as derivatives or analogues are those peptides that contain one or more naturally occurring amino acid derivative of the twenty standard amino acids, for example, 4-hydroxyproline, 5-hydroxylysine, 3-methylhistidine, homoserine, ornithine or carboxyglutamiate, and can include amino acids that are not linked by peptide bonds. Such peptide derivatives can be incorporated during synthesis of a peptide, or a peptide can be modified by well-known chemical modification methods (see, e.g., Glazer et al., Chemical Modification of Proteins, Selected Methods and Analytical Procedures, Elsevier Biomedical Press, New York (1975)).

The term "detectable marker" encompasses both selectable markers and assay markers. The term "selectable markers" refers to a variety of gene products to which cells transformed with an expression construct can be selected or screened, including drug-resistance markers, antigenic markers useful in fluorescence-activated cell sorting, adherence markers such as receptors for adherence ligands allowing selective adherence, and the like.

The term “detectable response” refers to any signal or response that may be detected in an assay, which may be performed with or without a detection reagent. Detectable responses include, but are not limited to, radioactive decay and energy (e.g., fluorescent, ultraviolet, infrared, visible) emission, absorption, polarization, fluorescence, phosphorescence, transmission, reflection or resonance transfer. Detectable responses also include chromatographic mobility, turbidity, electrophoretic mobility, mass spectrum, ultraviolet spectrum, infrared spectrum, nuclear magnetic resonance spectrum and x-ray diffraction. Alternatively, a detectable response may be the result of an assay to measure one or more properties of a biologic material, such as melting point, density, conductivity, surface acoustic waves, catalytic activity or elemental composition. A "detection reagent" is any molecule that generates a detectable response indicative of the presence or absence of a substance of interest. Detection reagents include any of a variety of molecules, such as antibodies, nucleic acid sequences and enzymes. To facilitate detection, a detection reagent may comprise a marker.

The term “devitalization”, as used herein in all of its grammatical forms, is any process which renders a tissue substantially or essentially free from reproductively or metabolically viable cells, without necessarily leaving the tissue essentially free of such cells and cellular components.

The term “differential label” as used herein generally refers to a stain, dye, marker, or antibody used to characterize or contrast structures, components or proteins of a single cell or organism.

The term “differentiation” as used herein refers to the process of development with an increase in the level of organization or complexity of a cell or tissue, accompanied with a more specialized function.

The terms “disease” or “disorder” as used herein refer to an impairment of health or a condition of abnormal functioning.

The term “disinfection”, as used herein in all of its grammatical forms, is any process which renders a tissue essentially free of viable pathogenic organisms and viruses by destroying them or otherwise inhibiting their growth or vital activity.

The term "dye" (also referred to as "fluorochrome" or "fluorophore") as used herein refers to a component of a molecule which causes the molecule to be fluorescent. The component is a functional group in the molecule that absorbs energy of a specific wavelength and re-emits energy at a different (but equally specific) wavelength. The amount and wavelength of the emitted energy depend on both the dye and the chemical environment of the dye. Many dyes are known, including, but not limited to, FITC, R-phycoerythrin (PE), PE-Texas Red Tandem, PE-Cy5 Tandem, propidium iodem, EGFP, EYGP, ECF, DsRed, allophycocyanin (APC), PerCp, SYTOX Green, courmarin, Alexa Fluors (350, 430, 488, 532, 546, 555, 568, 594, 633, 647, 660, 680, 700, 750), Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, Hoechst 33342, DAPI, Hoechst 33258, SYTOX Blue, chromomycin A3, mithramycin, YOYO-1, SYTOX Orange, ethidium bromide, 7-AAD, acridine orange, TOTO-1, TO-PRO-1, thiazole orange, TOTO-3, TO-PRO-3, thiazole orange, propidium iodide (PI), LDS 751, Indo-1, Fluo-3, DCFH, DHR, SNARF, Y66F, Y66H, EBFP, GFPuv, ECFP, GFP, AmCyanI, Y77W, S65A, S65C, S65L, S65T, ZsGreenI, ZsYellowI, DsRed2, DsRed monomer, AsRed2, mRFP1, HcRedI, monochlorobimane, calcein, the DyLight Fluors, cyanine, hydroxycoumarin, aminocoumarin, methoxycoumarin, Cascade Blue, Lucifer Yellow, NBD, PE-Cy5 conjugates, PE-Cy7 conjugates, APC-Cy7 conjugates, Red 613, fluorescein, FluorX, BODIDY-FL, TRITC, X¬rhodamine, Lissamine Rhodamine B, Texas Red, TruRed, and derivatives thereof.

The term "nonexpanded" as used herein refers to a cell population that has not been grown in culture (in vitro) to increase the number of cells in the cell population.

The term "endogenous" as used herein refers to that which is naturally occurring, incorporated within, housed within, adherent to, attached to or resident in.

The term "extracellular matrix" as used herein refers to a scaffold in a cell's external environment with which the cell interacts via specific cell surface receptors. The extracellular matrix serves many functions, including, but not limited to, providing support and anchorage for cells, segregating one tissue from another tissue, and regulating intracellular communication. The extracellular matrix is composed of an interlocking mesh of fibrous proteins and glycosaminoglycans (GAGs). Examples of fibrous proteins found in the extracellular matrix include collagen, elastin, fibronectin, and laminin. Examples of GAGs found in the extracellular matrix include proteoglycans (e.g., heparin sulfate), chondroitin sulfate, keratin sulfate, and non-proteoglycan polysaccharide (e.g., hyaluronic acid). The term "proteoglycan" refers to a group of glycoproteins that contain a core protein to which is attached one or more glycosaminoglycans.

The term "factors" as used herein refers to nonliving components that have a chemical or physical effect. For example, a "paracrine factor" is a diffusible signaling molecule that is secreted from one cell type that acts on another cell type in a tissue. A "transcription factor" is a protein that binds to specific DNA sequences and thereby controls the transfer of genetic information from DNA to mRNA.

The term "fluorescence" as used herein refers to the result of a three-state process that occurs in certain molecules, generally referred to as "fluorophores" or "fluorescent dyes," when a molecule or nanostructure relaxes to its ground state after being electrically excited. Stage 1 involves the excitation of a fluorophore through the absorption of light energy; Stage 2 involves a transient excited lifetime with some loss of energy; and Stage 3 involves the return of the fluorophore to its ground state accompanied by the emission of light.

The term "fluorescent-activated cell sorting" (also referred to as "FACS") as used herein refers to a method for sorting a heterogeneous mixture of biological cells into one or more containers, one cell at a time, based upon the specific light scattering and fluorescent characteristics of each cell.

The term "fossa" as used herein means a small cavity or depression, as in a bone.

The term "fragment" as used herein refers to a small part, which may be, without exclusion, a particle, chip, or fiber, derived from, cut off, or broken from a larger unit which retains the desired biological activity of the larger unit.

The term "functional equivalent" or "functionally equivalent" are used interchangeably herein to refer to substances, molecules, polynucleotides, proteins, peptides, or polypeptides having similar or identical effects or use.

The term "graft" as used herein refers to a tissue or organ transplanted from a donor to a recipient. It includes, but is not limited to, a self-tissue transferred from one body site to another in the same individual ("autologous graft"), a tissue transferred between genetically identical individuals or sufficiently immunologically compatible to allow tissue transplant ("syngeneic graft"), a tissue transferred between genetically different members of the same species ("allogeneic graft" or "allograft"), and a tissue transferred between different species ("xenograft").

The term "growth" as used herein refers to a process of becoming larger, longer or more numerous, or an increase in size, number, or volume.

The term "growth conduction" as used herein refers to a process by which a tissue is directed to regenerate or grow so as to conform to a material's surface. A growth-conductive surface is one that permits tissue growth on its surface or down into pores, channels or pipes. Growth-conductive material facilitates the spontaneous formation of a tissue by furnishing a microenvironment that supports deposition or adhesion of tissuegenic cells and optionally, vascularization. Examples of growth-conductive materials, include, but are not limited to, processed human bone (e.g.,

allograft bone, which may be an osteoconductive material), purified collagen, calcium phosphate ceramics, synthetic polymers, tissue-derived matrices, BMP-2 and 4, VEGF, bFGF, TGF-β, and PDGF.

The term "growth-conductive matrix" as used herein refers to a matrix that may be inert in and of itself but which supports three-dimensional tissue formation. For example, allograft bone tissue may be an osteoconductive matrix.

The term "growth factor" as used herein refers to extracellular polypeptide molecules that bind to a cell-surface receptor triggering an intracellular signaling pathway, leading to proliferation, differentiation, or other cellular response. Growth factors include, but are not limited to, cytokines and hormones.

The term "growth induction" as used herein refers to a process by which primitive, undifferentiated and tissuegenic cells are stimulated to develop into an ensemble of cells, not necessarily identical, that together carry out a specific function. This ensemble of cells is termed a tissue.

The term "growth-inductive matrix" as used herein refers to a matrix containing a substance or substances capable of recruiting or stimulating local tissuegenic cells so that the cells are induced (meaning to cause, bring about, bring about, or trigger) to differentiate and/or produce a tissue.

The terms "growth-inductive components" or "growth-inductive factors" or "tissuegenic factors" are used interchangeably to refer to the plethora of mediators associated with tissue development and repair.

For example, Table 11 lists exemplary growth-inductive factors secreted by adipose tissue classified according to metabolic, immunological or other function. (Halberg *et. al.*, 2008, Endocrinol. Metab. Clin. North Am., 37(3): 753-767). The subcutaneous adipose secretome includes adiponectin, leptin, IL-6, IL-7, IL-8, MCP-1, GRO, angiogenin, HGF, VEGF, TIMP-1, TIMP-2, etc. (Klimkakova *et. al.*, 2007, Biochem. Biophys. Res. Commun., 358: 897-902).

Table 11. Secreted Soluble non-ECM Factors of Adipose Secretome

Metabolic Factors	Immunological Factors	Other Factors
Adipsin	Alpha 1 acid glycoprotein	Angiogenin
Adiponectin	Colony stimulating factor-1	Angiopoietin 1
Apelin	Complement component inhibitor C1	Angiopoietin 2
ApoE	Complement C1	Angiotensinogen
Cortisol	Complement C2	Calcitonin
Insulin-like growth factor 1 (IGF-1)	Complement C3	Chemerin
Insulin-like growth factor (IGF)	Complement C4	Cyclophilin A
Binding protein 7 (Bp 7)	Complement C7	Extracellular SOD
Lipoprotein lipase	Complement factor B	Galectin 1
Leptin	Complement factor C	Growth related oncogene (GRO)
Fasting induced adipose factor	Complement factor D	Fibroblast growth factor (FGF)
Plasminogen activated inhibitor -1	C reactive protein	Hepatic growth factor (GF)
Resistin	Haptoglobin	Mineralcorticoid releasing factor (MRF)
Retinol binding protein 4	Interleukin 1 beta (IL-1β)	Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1)
Vaspin	Interleukin 4 (IL-4)	Nerve growth factor (NGF)
Vistafin	Interleukin 6 (IL-6)	Pigment epithelium derived factor (PEDF)
	Interleukin 7 (IL-7)	Prostaglandin E2
	Interleukin 8 (IL-8	Prostaglandin I2
	Interleukin 10 (IL-10)	Prostaglandin 2alpha
	Interleukin 12 (IL-12)	Serum transferring
	Interleukin 18 (IL-18)	Stromal derived factor 1
	Lipocalin 24p3	TGF beta
	Macrophage migration inhibitory factor 1	TIMP-1
	Serum amyloid A3 (SAA3)	TIMP-2
	Tumor necrosis factor alpha (TNF-α)	Tissue factor
		Vascular endothelial growth factor (VEGF)

The term "hematopoietic stem cell" refers to a cell isolated from the blood or from the bone marrow that can renew itself, differentiate to a variety of specialized cells,

mobilize out of the bone marrow into the circulating blood, and undergo programmed cell death (apoptosis). According to some embodiments of the described invention, hematopoietic stem cells derived from human subjects express at least one type of cell surface marker, including, but not limited to, CD34, CD38, HLA-DR, c-kit, CD59, Sca-1, Thy-1, and/or CXCR-4, or a combination thereof.

"HLA-DR" refers to a human class II histocompatibility antigen present on several cell types, including antigen-presenting cells, B cells, monocytes, macrophages, and activated T cells.

The term "interleukin" as used herein refers to a cytokine secreted by white blood cells as a means of communication with other white blood cells.

The term "implant" refers to any device or material inserted or placed, permanently or temporarily, into or onto a subject as well as those used for the administration or delivery of a therapeutic agent(s) or substance.

The term "improve" (or improving) as used herein refers to bring into a more desirable or excellent condition.

The terms "in the body", "void volume", "resection pocket", "excavation", "injection site", "deposition site" or "implant site" as used herein are meant to include all tissues of the body without limit, and may refer to spaces formed therein from injections, surgical incisions, tumor or tissue removal, tissue injuries, abscess formation, or any other similar cavity, space, or pocket formed thus by action of clinical assessment, treatment or physiologic response to disease or pathology as non-limiting examples thereof.

The term "indicator" as used herein refers to any substance, number or ratio derived from a series of observed facts that may reveal relative changes as a function of time; or a signal, sign, mark, note or symptom that is visible or evidence of the existence or presence thereof.

The term "inflammation" as used herein refers to the physiologic process by which vascularized tissues respond to injury. See, e.g., FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY, 4th Ed., William E. Paul, ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia (1999) at 1051-1053, incorporated herein by reference. During the inflammatory process, cells involved in detoxification and repair are mobilized to the compromised site by inflammatory mediators. Inflammation is often characterized by a strong infiltration of leukocytes at the site of inflammation, particularly neutrophils (polymorphonuclear cells). These cells promote tissue damage by releasing toxic substances at the vascular wall or in uninjured tissue. Traditionally, inflammation has been divided into acute and chronic responses.

The term "acute inflammation" as used herein refers to the rapid, short-lived (minutes to days), relatively uniform response to acute injury characterized by accumulations of fluid, plasma proteins, and neutrophilic leukocytes. Examples of injurious agents that cause acute inflammation include, but are not limited to, pathogens (e.g., bacteria, viruses, parasites), foreign bodies from exogenous (e.g. asbestos) or endogenous (e.g., urate crystals, immune complexes), sources, and physical (e.g., burns) or chemical (e.g., caustics) agents.

The term "chronic inflammation" as used herein refers to inflammation that is of longer duration and which has a vague and indefinite termination. Chronic inflammation takes over when acute inflammation persists, either through incomplete clearance of the initial inflammatory agent or as a result of multiple acute events occurring in the same location. Chronic inflammation, which includes the influx of lymphocytes and macrophages and fibroblast growth, may result in tissue scarring at sites of prolonged or repeated inflammatory activity.

The term "injury," as used herein, refers to damage or harm to a structure or function of the body caused by an outside agent or force, which may be physical or chemical.

The term "isolate" and its various grammatical forms as used herein refers to placing, setting apart, or obtaining a protein, molecule, substance, nucleic acid, peptide,

cell or particle, in a form essentially free from contaminants or other materials with which it is commonly associated, separate from its natural environment.

The term "labeling" as used herein refers to a process of distinguishing a compound, structure, protein, peptide, antibody, cell or cell component by introducing a traceable constituent. Common traceable constituents include, but are not limited to, a fluorescent antibody, a fluorophore, a dye or a fluorescent dye, a stain or a fluorescent stain, a marker, a fluorescent marker, a chemical stain, a differential stain, a differential label, and a radioisotope.

The term "labile" as used herein refers to subject to increased degradation.

The terms "marker" or "cell surface marker" are used interchangeably herein to refer to an antigenic determinant or epitope found on the surface of a specific type of cell. Cell surface markers can facilitate the characterization of a cell type, its identification, and eventually its isolation. Cell sorting techniques are based on cellular biomarkers where a cell surface marker(s) may be used for either positive selection or negative selection, i.e., for inclusion or exclusion, from a cell population.

The term "matrix" refers to a surrounding substance within which something is contained or embedded.

The term "mechanical agitation" as used herein refers to a process whereby tissue is physically shaken or churned via mechanical means. Such mechanical means include, but are not limited to, a mixer or other mechanical device.

The term "mesenchymal stem cells (MSCs)" as used herein refers to non-blood adult stem cells found in a variety of tissues. They are characterized by their spindle-shape morphologically; by the expression of specific markers on their cell surface; and by their ability under appropriate conditions, to differentiate along a minimum of three lineages (osteogenic, chondrogenic and adipogenic). When referring to bone or cartilage, MSCs commonly are known as osteochondrogenic, osteogenic, or chondrogenic, since a single MSC has shown the ability to differentiate into chondrocytes or osteoblasts, depending on the medium.

MSCs secrete many biologically important molecules, including interleukins 6, 7, 8, 11, 12, 14, and 15, M-CSF, Flt-3 ligand, SCF, LIF, bFGF, VEGF, PlGF and MCP1 (Majumdar, et al., J. Cell Physiol. 176: 57-66 (1998), Kinnaird et al, Circulation 109: 1543-49 (2004)). In 2004, it was reported that no single marker that definitively identifies MSCs in vivo had yet been identified, due to the lack of consensus from diverse documentations of the MSC phenotype. Baksh, et al., J. Cell. Mol. Med. 8(3): 301-16, 305 (2004). There is general agreement that MSCs lack typical hematopoietic antigens, namely CD14, CD34, and CD45. (Id.; citing Pittenger, M.F. et al., Science 284: 143-47 (1999)).

The term "mill," and its various grammatical forms, as used herein refers to operations performed to grind, to cut, to shred, to chip, or to pulverize a substance, or equipment for performing such operations on a substance. The term "freezer-mill" and its various grammatical forms, as used herein refers to mill a substance in a frozen state, or equipment for performing such operations.

The term "mounted section thickness" as used herein, refers to the thickness of tissue sections after histological processing.

The term "multipotent" as used herein refers to a cell capable of giving rise to a limited number of cell types of a particular cell line.

The term "myogenic" refers to a potential of undifferentiated precursor cells to differentiate into a muscle forming or myocompetent cells.

The term "Optical Disector" refers to a stereological probe for counting or selecting objects in a tissue section. This is an extension to the basic Disector method, which is applied to a thick section using a series, or stack, of Disectors. Rather than using pairs of physical sections (the basic Disector method), optical sectioning is used by creating focal planes with a thin depth-of-field through the section. The Optical Disector begins with a lookup section at the top of the optical disector and ends with a reference section at the bottom of the optical disector. The focal plane is the current reference section. The lookup section is immediately above the focal plane. A particle

in focus at the top of the optical disector is therefore seen in the lookup section and not counted. A particle in focus at the bottom of the optical disector is in the reference section and therefore not in the lookup section, is counted. Counting frame rules are applied when the particle first comes into focus.

The term "osteoblasts" as used herein refers to cells that arise when osteoprogenitor cells or mesenchymal cells, which are located near all bony surfaces and within the bone marrow, differentiate under the influence of growth factors. Osteoblasts, which are responsible for bone matrix synthesis, secrete a collagen rich ground substance essential for later mineralization of hydroxyapatite and other crystals. The collagen strands to form osteoids (spiral fibers of bone matrix). Osteoblasts cause calcium salts and phosphorus to precipitate from the blood, which bond with the newly formed osteoid to mineralize the bone tissue. Once osteoblasts become trapped in the matrix they secrete, they become osteocytes. From least to terminally differentiated, the osteocyte lineage is (i) colony-forming unit-fibroblast (CFU-F); (ii) mesenchymal stem cell / marrow stromal cell (MSC); (iii) osteoblast; and (iv) osteocyte.

The term "osteocalcin" as used herein refers to a protein constituent of bone; circulating levels are used as a marker of increased bone turnover.

The term "osteoclast" as used herein refers to large multinucleate cells associated with areas of bone resorption (breakdown).

The term "osteoconduction" as used herein refers to a process by which bone is directed so as to conform to a material's surface. An osteoconductive surface is one that permits bone growth on its surface or down into pores, channels or pipes. Osteoconductive material facilitates the spontaneous formation of bone by furnishing a microenvironment that supports the ingrowth of blood vessels, perivascular tissue and osteoprogenitor cells into the site where it is deposited. Examples of osteoconductive materials, include, but not limited to, processed human bone (e.g., allograft bone), purified collagen, calcium phosphate ceramics, synthetic polymers, BMP-2 and 4, VEGF, bFGF, TGF-β, and PDGF.

The term "osteoconductive matrix" as used herein refers to a matrix that is inert in and of itself but on which cells can climb and grow bone.

The term "osteogenic" refers to a potential of undifferentiated precursor cells to differentiate into bone forming or osteocompetent cells .

The term "osteogenesis" as used herein refers to the development or formation of new bone by bone forming or osteocompetent cells.

The term "osteoinduction" as used herein refers to a process by which primitive, undifferentiated and pluripotent cells are stimulated to develop into a bone forming cell lineage thereby inducing osteogenesis. For example, the majority of bone healing in a fracture is dependent on osteoinduction. Osteoinductive materials can be generated by combining a porous scaffold with osteogenic cells and/or osteoinductive components, including, but not limited to, growth factors such as BMP-2 and 4, VEGF, bFGF, TGF-β, and PDGF.

The term "osteoinductive matrix" as used herein refers to a matrix containing a substance or substances that recruit local cells to induce (meaning to cause, bring about, bring about, or trigger) local cells to produce bone.

The terms "osteoinductive components" or "osteogenic factors" are used interchangeably to refer to the plethora of mediators associated with bone development and repair, including, but not limited to, bone morphogenic proteins (BMPs), vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), transforming growth factor beta (TGFβ), and platelet-derived growth factor (PDGF).

The term "osteointegration" refers to an anchorage mechanism whereby nonvital components can be incorporated reliably into living bone and that persist under all normal conditions of loading.

The term "particle" as used herein refers to a chip, fragment, slice, fiber or other small constituent of a larger body (e.g., picoparticles, nanoparticles, microparticles,

milliparticle, centiparticle, deciparticle; fractions thereof, or, in some instances, a larger segment or piece).

The term "piece" as used herein refers to a particle, section, strip, chip, fragment, slice, fiber or other part, derived from, cut off, or broken from a larger unit.

The term "peptide" is used herein to refer to two or more amino acids joined by a peptide bond.

The term "periosteum" as used herein refers to the normal investment of bone, consisting of a dense, fibrous outer layer, to which muscles attach, and a more delicate, inner layer capable of forming bone.

The term "Platelet Derived Growth Factor" (PDGF) as used herein refers to a major mitogen for connective tissue cells and certain other cell types. It is a dimeric molecule consisting of disulfide-bonded, structurally similar A and B-polypeptide chains, which combine to homo- and hetero-dimers. The PDGF isoforms exert their cellular effects by binding to and activating two structurally related protein tyrosine kinase receptors, the α-receptor and the β-receptor. Activation of PDGF receptors leads to stimulation of cell growth, but also to changes in cell shape and motility; PDGF induces reorganization of the actin filament system and stimulates chemotaxis, i.e., a directed cell movement toward a gradient of PDGF. In vivo, PDGF plays a role in embryonic development and during wound healing.

The term "pluripotent" as used herein refers to the ability to develop into multiple cells types, including all three embryonic lineages, forming the body organs, nervous system, skin, muscle and skeleton.

The term "progenitor cell" as used herein refers to an early descendant of a stem cell that can only differentiate, but can no longer renew itself. Progenitor cells mature into precursor cells that mature into mature phenotypes. Hematopoietic progenitor cells are referred to as colony-forming units (CFU) or colony-forming cells (CFC). The specific lineage of a progenitor cell is indicated by a suffix, such as, but not limited to, CFU-E (erythrocytic), CFU-F (fibroblastic), CFU-GM (granulocytic/macrophage), and

CFU-GEMM (pluripotent hematopoietic progenitor). Osteoclasts arise from hematopoietic cells of the monocyte/neutrophil lineage (CFU-GM). Osteoprogenitor cells arise from mesenchymal stem cells and are committed to an osteocyte lineage.

The term "propagate" as used herein refers to reproduce, multiply, or to increase in number, amount or extent by any process.

The term "purification" as used herein refers to the process of isolating or freeing from foreign, extraneous, or objectionable elements.

The term "random" as used herein refers to unpredictable. There is some element of chance. This is the opposite of deterministic, in which the next number or event is knowable.

The term "reduced" or "to reduce", as used herein in all of its grammatical forms, refers to a diminishing, a decrease in, an attenuation or abatement of the degree, intensity, extent, size, amount, density or number of.

The term "regeneration" or "regenerate" as used herein refers to a process of recreation, reconstitution, renewal, revival, restoration, differentiation and growth to form a tissue with characteristics that conform with a natural counterpart of the tissue.

The term "relative" as used herein refers to something having, or standing in, some significant association to something else. The term "relative frequency" as used herein refers to the rate of occurrence of something having or standing in some significant association to the rate of occurrence of something else. For example, two cell types, X cells and Y cells occupy a given location. There are 5 X cells and 5 Y cells in that location. The relative frequency of cell type X is 5/10; the relative frequency of cell type Y is 5/10 in that location. Following processing, there are 5 X cells, but only 1 Y cell in that location. The relative frequency of cell type X following processing is 5/6, and the relative frequency of cell type Y following processing is 1/6 in that location.

The term "repair" as used herein as a noun refers to any correction, reinforcement, reconditioning, remedy, making up for, making sound, renewal, mending,

patching, or the like that restores function. When used as a verb, it means to correct, to reinforce, to recondition, to remedy, to make up for, to make sound, to renew, to mend, to patch or to otherwise restore function. According to some embodiments "repair" includes full repair and partial repair.

The term "resident," and its various grammatical forms, as used herein refers to being present habitually, existing in or intrinsic to or incorporated therein.

The term "rinse," and its various grammatical forms, as used herein refers to wash, to douse with a liquid or liquids or to flow a liquid or liquids over the material being rinsed.

The term "scaffold" as used herein refers to a structure capable of supporting a three-dimensional tissue formation. A three-dimensional scaffold is believed to be critical to replicate the in vivo milieu and to allow the cells to influence their own microenvironment. Scaffolds may serve to promote cell attachment and migration, to deliver and retain cells and biochemical factors, to enable diffusion of vital cell nutrients and expressed products, and to exert certain mechanical and biological influences to modify the behavior of the cell phase. A scaffold utilized for tissue reconstruction has several requisites. Such a scaffold should have a high porosity and an adequate pore size to facilitate cell seeding and diffusion of both cells and nutrients throughout the whole structure. Biodegradability of the scaffold is also an essential requisite. The scaffold should be absorbed by the surrounding tissues without the necessity of a surgical removal, such that the rate at which degradation occurs coincides as closely as possible with the rate of tissue formation. As cells are fabricating their own natural matrix structure around themselves, the scaffold provides structural integrity within the body and eventually degrades leaving the neotissue (newly formed tissue) to assume the mechanical load.

The term "section" when used in the context of stereology refers to a cut through material that has effectively zero thickness compared to the size of the particles being studied. Biologists refer to sections as thick slices through tissue. The actual thickness of sections can leads to the Holmes effect.

The term “side-effect” as used herein refers to a result of a therapy in addition to, or in extension of, the desired therapeutic effect.

The term "similar" is used interchangeably with the terms analogous, comparable, or resembling, meaning having traits or characteristics in common.

The term “size reduction”, as used herein in all of its grammatical forms, refers to a process by which an object, such as a tissue, is divided or reduced in size. Such processes include, without limitation, cutting, slicing, chopping, grinding, milling, freezer-milling, blending, homogenizing, tearing, shredding, fracturing, breaking, crushing, and morselizing.

A "solution" generally is considered as a homogeneous mixture of two or more substances. It is frequently, though not necessarily, a liquid. In a solution, the molecules of the solute (or dissolved substance) are uniformly distributed among those of the solvent. The term “solvent” as used herein refers to a substance capable of dissolving another substance (termed a “solute”) to form a uniformly dispersed mixture (solution).

The term “stain” as used herein refers to a composition of a dye(s) or pigment(s) used to make a structure, a material, a cell, a cell component, a membrane, a granule, a nucleus, a cell surface receptor, a peptide, a microorganism, a nucleic acid, a protein or a tissue differentiable.

The term "Sca-1" or "stem cell antigen-1" refers to a surface protein component in a signaling pathway that affects the self-renewal ability of mesenchymal stem cells.

The term "stem cells" refers to undifferentiated cells having high proliferative potential with the ability to self-renew (make more stem cells by cell division) that can generate daughter cells that can undergo terminal differentiation into more than one distinct cell phenotype.

The term “stereology” as used herein refers to a method of quantifying 2D and 3D structures using estimation methods.

The term “sterilization”, as used herein in all of its grammatical forms, is any process that renders an object (e.g., a tissue, a container for tissue, or an implement for processing tissue) essentially free from pathogenic organisms and/or viruses by destroying them or otherwise inhibiting their growth or vital activity. Such processes may include exposure of the object to one or more, without limitation, of gamma radiation, electron beam radiation, chemical agents (e.g., alcohol, phenol, ethylene oxide gas, acids, bases, or peroxides), heat, or ultraviolet radiation for sufficient duration and dosages. When sterilization is performed on a finished tissue product in its final packaging, the process may be referred to as “terminal sterilization”.

The term "stimulate", as used herein in all of its grammatical forms, as used herein refers to activate, provoke, or spur. The term "stimulating agent" as used herein refers to a substance that exerts some force or effect.

The term “subcutaneous”, as used herein with reference to tissues, refers to tissues that are beneath the dermis and not part of the dermis (i.e, the hypodermis), and may interchangeably used with the term “subdermal”.

The phrase “subject in need thereof” as used herein refers to a patient that (i) will be administered at least one allograft, (ii) is receiving at least one allograft; or (iii) has received at least one allograft, unless the context and usage of the phrase indicates otherwise.

The term “substantially similar” as used herein means that a first value, aspect, trait, feature, number, or amount is of at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, or at least 95% of a second value, aspect, trait, feature, number, or amount.

The term “surfactant”, as used herein, refers to a surface-active agent that acts to reduce surface tension, which is the elastic like force existing in the surface of a body, e.g., a liquid, at an interface between two liquids, or that between a liquid and a solid, tending to minimize the area of the surface, caused by asymmetries in the intermolecular forces between surface molecules. Surfactants usually are organic

compounds that contain both hydrophobic groups and hydrophilic groups, i.e., are amphiphilic. Surfactants can be anionic, cationic, nonionic, and zwitterionic. Exemplary surfactants include, but are not limited to, Triton®, Tween® 80, egg lecithin, vitamin E-t d-α-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS). Exemplary surfactants suitable for use in this invention are described in, for example, Becher, Emulsions Theory and Practice; Robert E. Krieger Publishing, Malabar, Fla. (1965), which is incorporated herein by reference.

The term “symptom” as used herein refers to a sign or an indication of disorder or disease, especially when experienced by an individual as a change from normal function, sensation, or appearance.

The term "therapeutic effect" as used herein refers to a consequence of treatment, the results of which are judged to be desirable and beneficial. A therapeutic effect may include, directly or indirectly, the arrest, reduction, or elimination of a disease manifestation. A therapeutic effect also may include, directly or indirectly, the arrest reduction or elimination of the progression of a disease manifestation.

The term “tissuegenic” as used herein refers to a potential of an undifferentiated precursor cell to differentiate into a mature cell type and to regenerate a tissue. Exemplary tissuegenic cells include but are not limited to a stem cell, a progenitor cell or a combination thereof. The term “osteogenic” refers more specifically to cell differentiation and tissue regeneration with regard to bone.

The term “transforming growth factor beta (TGFβ) signaling pathway” is used herein to refer to the signaling pathway is involved in many cellular processes in both the adult organism and the developing embryo including cell growth, cell differentiation, apoptosis, cellular homeostasis and other cellular functions. TGFβ superfamily ligands bind to a type II receptor, which recruits and phosphorylates a type I receptor. The type I receptor then phosphorylates receptor-regulated SMADs (R-SMADs) which can now bind the coSMAD SMAD4. R-SMAD/coSMAD complexes accumulate in the nucleus where they act as transcription factors and participate in the regulation of target gene expression.

The term “treat” or “treating” includes abrogating, substantially inhibiting, slowing or reversing the progression of a disease, condition or disorder, substantially ameliorating clinical or esthetical symptoms of a condition, substantially preventing the appearance of clinical or esthetical symptoms of a disease, condition, or disorder, and protecting from harmful or annoying symptoms. Treating further refers to accomplishing one or more of the following: (a) reducing the severity of the disorder; (b) limiting development of symptoms characteristic of the disorder(s) being treated; (c) limiting worsening of symptoms characteristic of the disorder(s) being treated; (d) limiting recurrence of the disorder(s) in patients that have previously had the disorder(s); and (e) limiting recurrence of symptoms in patients that were previously asymptomatic for the disorder(s).

The term “vascularization” as used herein refers to a process of ingrowth of blood vessels and perivascular tissue within a growth-conductive matrix to support the deposition and adhesion of tissuegenic cells to effect tissue regeneration.

The terms “VEGF”, "VEGF-1" or "vascular endothelial growth factor-1" are used interchangeably herein to refer to a cytokine that mediates numerous functions of endothelial cells including proliferation, migration, invasion, survival, and permeability. The term “VEGF-2” refers to a regulator for growth of vascular endothelial and smooth muscle cells. VEGF-2 stimulates the growth of human vascular endothelial cells but inhibits growth of human aortic smooth muscle cells induced by platelet-derived growth factor.

The term “viable” as used herein refers to having the ability to grow, expand, or develop; capable of living.

The term “xenogeneic” as used herein refers to cells or tissues derived from individuals of different species, including, but not limited to, porcine, bovine, caprine, equine, canine, lapine, feline, and/or non-human mammals, such as, but not limited to, whale, and porpoise.

IMPLANTS CONTAINING DECELLULARIZED MATRIX

Embodiments of the present invention include implants having a decellularized matrix, and, optionally, exogenous tissuegenic cells, growth factors, and a carrier. According to some embodiments, the implant is in the form of a sheet. According to some embodiments, the implant is in particulate form. According to some embodiments, the implant is in the form of a paste, gel, or slurry. According to some embodiments, the implant is injectable. According to some embodiments, the implant is in a dried, pre-formed shape. According to some embodiments, the implant is in a porous form. According to some embodiments, the implant is in a fibrous form. According to some embodiments, the implant fills a void in a tissue. According to some embodiments, the implant is in bulking agent.

According to some embodiments, the implant is a scaffold for the delivery of growth-inductive factors. According to some embodiments, the implant is growth-inductive. According to some embodiments, the implant is a scaffold for the delivery of cells. According to some embodiments, the implant is a scaffold for the migration cells. According to some embodiments, the implant is a growth-conductive medium for the in-growth of tissue.

Shaped Acellular Tissue

According to some embodiments of the present invention, shaped decelluarized tissues (also referred to herein as "shaped acellular tissues") include three-dimensional shaped structures formed by a process in which acellular tissues are broken into smaller components (e.g., by milling or homogenization), then reformed into a three-dimensional structure that is different from the source tissue. All soft tissue types discussed in the present application may be used, either alone or in combination with one another. Tissue types can be allografts, autographs or xenografts. Suitable acellular tissues may be prepared using methods disclosed in the present application. Exemplary tissues suitable for forming shaped acellular tissues according to embodiments of the present invention include delipidated, decellularized adipose tissues and delipidated, decellularized dermal tissues.

According to some embodiments of the present invention, acellular tissues are mechanically or chemically manipulated into a particulate form, which can be resuspended in a liquid (e.g., water or a buffer solution) to form a flowable mass, such as a slurry. The flowable mass may be poured into a mold of a desired shape, in which it may form a porous or sponge-like shaped acellular tissue. According to some embodiments, the liquid and the acellular tissue particles are manipulated to form a putty, which can then be molded into a desired shape. According to some embodiments, the liquid and the acellular tissue particles are manipulated to form a paste. According to some embodiments, the liquid and the acellular tissue particles are manipulated to form a gel. According to some embodiments, the gel is formed during the process used to delipidize and decellularize the tissue. According to some embodiments, the acellular tissue particles are mixed with a polymer to form a paste or a putty. According to some embodiments, the porous or sponge-like shaped acellular tissue is formed by drying the slurry, paste or gel. According to some embodiments, the porous or sponge-like shaped acellular tissue is formed by lyophilizing the slurry, paste or gel. According to some embodiments, the porosity of the shaped acellular tissue is controlled selecting the amount of liquid relative to the amount of particulate acellular tissue particles. According to some embodiments, the porous or sponge-like shaped acellular material is a solid piece that conforms to the shape of the mold after being dried.

According to some embodiments, the shaped acellular tissue is formed by one or more of the processes of molding a slurry, paste, or gel, machining a sponge-like shaped acellular tissue into a different shape, using three-dimensional ("3-D") printing to deposit a flowable slurry, paste, or gel into a three-dimensional shape, laminating pieces of shaped acellular tissue, and other technologies known for use in shaping three-dimensional objects from soft or flowable materials. According to some embodiments, shaped acellular materials may be provided in a lyophilized, cryopreserved, or frozen form.

According to some embodiments of the present invention, shaped acellular tissues may be used to surgically repair defects in a patient. According to some

embodiments, shaped acellular tissues are used alone or after being seeded or cultured with appropriate exogenous tissuegenic cells. According to some such embodiments, the cells may be either autologous or allogeneic, or a mixture of autologous and allogeneic cells. According to some embodiments, the shaped acellular tissues are provided with substances such as growth factors, proteins, angiogenic factors and/or controlled-release nanotubes/nanoparticles that preferentially secrete factors for specific processes. According to some embodiments, the substances are added to the slurry, paste, or gel before the shaped acellular tissue is formed. According to some embodiments, the substances are added to the shaped acellular tissue after it is formed.

According to some embodiments of the present invention, the degradation profile of the shaped acellular tissue and a substance therein cause the substance to be released at an appropriate time for growth or healing of tissues to occur. An example of this would be to promote the formation of vasculature necessary to supply cells within or adjacent to a shaped acellular tissue with nutrients. In such an example, specific factors, cells, and other substances, if needed, may be provided at selected locations on the shaped acellular tissue to promote angiogenesis at the desired locations. Other factors may be included that do not promote angiogenesis, such that vasculature is formed only where is it desired. As a more specific example, the creation of a kidney using a shaped acellular tissue would include such factors and cells needed to preferentially create architecture for renal arteries, renal veins, a ureter, and other features of a functional kidney.

According to some embodiments of the present invention, the shaped acellular tissues have simple shapes. According to some embodiments, the shaped acellular tissues have complex shapes. According to some embodiments, the shaped acellular tissues have symmetrical shapes. According to some embodiments, the shaped acellular tissues have asymmetrical shapes. According to some embodiments, the shaped acellular tissues have shapes similar to the shapes of anatomical structures. According to some embodiments, the shaped acellular tissues have the shapes of anatomical organs.

According to some embodiments, the shaped acellular tissues are provided for ex vivo use. According to some embodiments, the shaped acellular tissues are provided for in vivo use (i.e., for implantation). According to some embodiments, the shaped acellular tissues have porosities customized for their intended use. According to some embodiments of the present invention, the shaped acellular tissues have pH customized for their intended use. According to some embodiments, the shaped acellular tissues include cross-linked collagen. According to some embodiments of the present invention, the shaped acellular tissues include cross-linked non-collagen components. According to some embodiments, the shaped acellular tissues have biological polymers that are cross-linked with non-biological (i.e., synthetic) polymers.

According to some embodiments of the present invention, a method of forming a shaped acellular tissue includes a step of scanning or imaging a portion of a patient's body (e.g., a portion of patient's face or other anatomical structure), then making shaped acellular tissues to replace those anatomical structures. In other embodiments, a shaped acellular tissue is made to restore the shape of an anatomical structure. In other embodiments, a shaped acellular tissue is made to provide a substitute for a missing anatomical structure.

According to some embodiments of the present invention, the shaped acellular tissue is formed, then cultured in vitro with exogenous cells. When the cells reach a sufficient number, the shaped acellular tissue is implanted for plastic and/or reconstructive surgery.

According to some embodiments of the present invention, the shaped acellular tissue is formed, then cultured in vitro with cells. When the cells reach a sufficient number, the composition is cryopreserved, and then reconstituted when needed for use.

According to an embodiment of the present invention, mesenchymal stem cells are harvested from a patient in need of a nasal graft, cultured onto a shaped acellular tissue resembling the patient's own nasal structure. After the cells have differentiated into a sufficient number of chondrocytes, the shaped acellular tissue can be provided to the patient as a viable graft.

According to an embodiment of the present invention, a shaped acellular tissue is provided in a lyophilized form. The lyophilized shaped acellular tissue is rehydrated in the operating room, where it may be combined with such substances as the patient's platelet-rich plasma (PRP), autologous cells such as those obtained from the patient's bone marrow or stromal vascular fraction (SVF) (e.g,. SVF from adipose tissue obtained by liposuction), allogeneic cells such as those obtained from a cell bank (e.g., stem cells, progenitor cells or other cell types available from cell banks), or bone marrow and bone marrow components including bone marrow cells (both autologous and allogeneic).

Embodiments of the present invention include methods of making the various embodiments of shaped acellular tissues described above. Embodiments of such methods will be obvious to those having ordinary skill in the art and possession of the present disclosure.

Decellularized Matrix

According to one aspect, the described invention provides a decellularized matrix (also referred to herein as an "acellular matrix") derived from a biological tissue, and suitable for implantation into a patient. The decellularized matrix comprises ECM from which unwanted cells and cell fragments have been removed. According to one embodiment, the tissue is autologous to the patient. According to another embodiment, the tissue is allogeneic to the patient. According to yet another embodiment, the tissue is xenogeneic to the patient.

According to one embodiment, the tissue is selected from the group consisting of an adipose tissue, an amnion tissue, an artery tissue, a cartilage tissue, a connective tissue, a chorion tissue, a colon tissue, a non-calcified dental tissue, a dermal tissue, a duodenal tissue, an endothelial tissue, an epithelial tissue, a fascial tissue, a gastrointestinal tissue, a gingival tissue, a growth plate tissue, an intervertebral disc tissue, an intestinal mucosal tissue, an intestinal serosal tissue, a ligament tissue, a liver tissue, a lung tissue, a mammary tissue, a membranous tissue, a meniscal tissue, a muscle tissue, a nerve tissue, an ovarian tissue, a parenchymal organ tissue, a

pericardial tissue, a periosteal tissue, a peritoneal tissue, a placental tissue, a skin tissue, a spleen tissue, a stomach tissue, a synovial tissue, a tendon tissue, a testes tissue, an umbilical cord tissue, a urological tissue, a vascular tissue, a vein tissue, other non-calcified tissues, and a combination thereof.

According to one embodiment, the source of the tissue is a mammalian donor. According to one embodiment, the source of the tissue is a human donor. According to one embodiment, the human donor is a living donor. According to another embodiment, is the human donor is a cadaveric donor. According to yet another embodiment, the tissue donor is the intended recipient of the acellular matrix.

Adipose Tissue

According to some embodiments, the tissue comprises an adipose tissue derived from an adipose-rich body region.

According to some embodiments, the adipose rich body region is selected from the group consisting of an abdomen, a hip, a hypodermal region of skin, an infrapatellar fat pad, a knee, a mammary organ, a thigh, and a combination thereof.

According to some embodiments, the tissue is an adipose tissue selected from the group consisting of a visceral adipose tissue, a hypodermal adipose tissue and, a combination thereof. According to some embodiments, the tissue is an adipose tissue comprising a visceral adipose tissue. According to some embodiments, the tissue is an adipose tissue comprising a subcutaneous adipose tissue.

According to one embodiment, the source of the tissue is a mammalian donor. According to some embodiments, the tissue is an adipose tissue derived from an adipose-rich body region of a human donor. According to some embodiments, the human donor is a cadaveric donor. According to some embodiments, the human donor is a living donor.

According to one embodiment, the tissue is an adipose tissue derived from an autologous adipose tissue. According to one embodiment, the tissue is an adipose

tissue comprising an adipose tissue derived from an allogeneic adipose tissue. According to one embodiment, the tissue is an adipose tissue comprising an adipose tissue derived from a xenogeneic adipose tissue.

Cartilage Tissue

According to some embodiments, the tissue comprises a cartilage tissue selected from the group consisting of a hyaline cartilage tissue, a fibrocartilage tissue, an elastic cartilage tissue, and a combination thereof. According to some embodiments, the tissue comprises a hyaline cartilage tissue. According to some embodiments, the tissue comprises a fibrocartilage cartilage tissue. According to some embodiments, the tissue comprises an elastic cartilage tissue.

According to some embodiments, the tissue comprises a cartilage tissue derived from a cartilaginous organ or at least one fragment thereof.

According to some embodiments, the cartilaginous organ is selected from the group consisting of an articular cartilage organ, a bronchus, a growth plate, an intervertebral disc, a larynx, a meniscus, a nose, a trachea, and a combination thereof.

According to one embodiment, the source of the tissue is a mammalian donor. According to some embodiments, the tissue comprises a cartilage tissue derived from a human donor. According to some embodiments, the human donor is a cadaveric donor. According to some embodiments, the human donor is a living donor.

According to one embodiment, the tissue is a cartilage tissue derived from an autologous cartilage tissue. According to one embodiment, the tissue is a cartilage tissue derived from an allogeneic cartilage tissue. According to one embodiment, the tissue is a cartilage tissue derived from a xenogeneic cartilage tissue.

Non-Calcified Dental Tissue

According to some embodiments, the tissue comprises a non-calcified dental tissue. According to some such embodiments, the tissue comprises a dental pulp tissue.

According to some embodiments, the tissue comprises a dental pulp tissue derived from at least one tooth. According to some embodiments, the tissue comprises a dental pulp tissue derived from a plurality of teeth.

According to some embodiments, the tooth is selected from the group consisting of a deciduous tooth, a permanent tooth, and a combination thereof. According to some embodiments, the tooth is a deciduous tooth. According to some embodiments, the tooth is a permanent tooth.

According to one embodiment, the source of the tissue is a dental pulp tissue derived from a mammalian donor. According to some embodiments, the tissue is a dental pulp tissue derived from a human donor. According to some embodiments, the human donor is a cadaveric donor. According to some embodiments, the human donor is a living donor.

According to one embodiment, the tissue is an autologous dental pulp tissue. According to one embodiment, the tissue is an allogeneic dental pulp tissue. According to one embodiment, the tissue is a xenogeneic dental pulp tissue.

Epithelial Tissue

According to some embodiments, the tissue comprises an epithelial tissue selected from the group consisting of a cutaneous epithelial tissue, a mucous epithelial tissue, a serous epithelial tissue, and a combination thereof. According to some embodiments, the tissue comprises a basement membrane tissue.

According to some embodiments, the tissue comprises an epithelial tissue derived from an epithelial organ or at least one fragment thereof.

According to some embodiments, the epithelial tissue is selected from the group consisting of a gastrointestinal lining, an intestinal mucosal lining, an intestinal serosal lining, a pericardial lining, a peritoneal lining, a pleural lining, a reproductive lining, a respiratory lining, and a urinary lining.

According to some embodiments, the gastrointestinal lining is selected from the group consisting of a duodenum lining, an esophagus lining, an ileum lining, a jejunum lining, a large intestine lining, a mouth lining, a pharynx lining, a small intestine lining, a stomach lining, and a combination thereof.

According to some embodiments, the epithelial organ is selected from the group consisting of a gastrointestinal organ, a respiratory organ, a urological organ, and a combination thereof.

According to some embodiments, the gastrointestinal organ is selected from the group consisting of a duodenum, an esophagus, an ileum, a jejunum, a large intestine, a mouth, a gingiva, a small intestine, a stomach, and a combination thereof.

According to some embodiments, the respiratory organ is selected from the group consisting of a bronchii, a diaphragm, a heart, a larynx, a lung, a mouth, a nose, a pharynx, a trachea, and a combination thereof.

According to some embodiments, the urological organ is selected from the group consisting of an adrenal gland, an epididymis, a kidney, an ovary, a penis, a prostate gland, a seminal vesicle, a testes, a ureter, a urethra, a urinary bladder, a vas deferens, and a combination thereof.

According to some embodiments, the epithelial organ is selected from the group consisting of a duodenum, an esophagus, a heart, an ileum, a jejunum, a large intestine, a lung, a mouth, a gingiva, a pharynx, a small intestine, a skin, a stomach, and a combination thereof.

According to one embodiment, the source of the tissue is a mammalian donor. According to some embodiments, the tissue is an epithelial tissue derived from a human donor. According to some embodiments, the human donor is a cadaveric donor. According to some embodiments, human donor is a living donor.

According to one embodiment, the tissue is an epithelial tissue derived from an autologous epithelial tissue. According to one embodiment, the tissue is an epithelial

tissue derived from an allogeneic epithelial tissue. According to one embodiment, the tissue is an epithelial tissue derived from a xenogeneic epithelial tissue.

Fascial Tissue

According to some embodiments, the tissue comprises a fascial tissue selected from the group consisting of a superficial fascia, a deep fascia, a visceral fascia, and a combination thereof. The term "fascia" as used herein refers to a fibroareolar connective tissue lamellae distributed throughout the body surrounding delicate organs.

According to some embodiments, the tissue comprises a fascial tissue derived from a fascia-rich body part or at least one fragment thereof. According to some embodiments, the fascia-rich body part is selected from the group consisting of an arm, a back, an elbow, a foot, a hand, a head, a knee, a leg, a muscle, a neck, a skin, a thigh, a toe, a wrist, and a combination thereof.

According to some embodiments, the tissue comprises fascial tissue selected from the group consisting of a myofascia associated with a muscle, palmar fascia associated with a palm of a hand, plantar fascia associated with a sole of a foot, thoracolumbar fascia associated with a back, fascii lata associated with a thigh, tensor fascia lata associated with tendon tissue, and a combination thereof.

According to one embodiment, the source of the tissue is a mammalian donor. According to some embodiments, the tissue comprises a fascia tissue derived from a human donor. According to some embodiments, the human donor is a cadaveric donor. According to some embodiments, human donor is a living donor.

According to one embodiment, the tissue is a fascial tissue derived from an autologous fascia. According to one embodiment, the tissue is a fascial tissue derived from an allogeneic fascia. According to one embodiment, the tissue is a fascial tissue derived from a xenogeneic fascia.

Ligament Tissue

According to some embodiments, the tissue comprises a ligament tissue selected from the group consisting of a capsular ligament, an extra-capsular ligament, an intracapsular ligament, a cruciate ligament, and a combination thereof. The term "ligament" as used herein refers to a band or sheet of fibrous tissue connecting two or more bones, cartilages, or other structures, or serving as support for fasciae or muscles and a fold of peritoneum supporting any of the abdominal viscera

According to some embodiments, the tissue comprises a ligament tissue derived from a ligament-rich body part or at least one fragment thereof. According to some embodiments, the ligament-rich body part is selected from the group consisting of an arm, an elbow, a foot, a hand, a head, a knee, a leg, a neck, a pelvis, a phalange, a thorax,a toe, a wrist, and a combination thereof.

According to some embodiments, the tissue comprises a ligament tissue derived from a ligament organ or a fragment thereof. According to some embodiments, the ligament organ is selected from the group consisting of a joint, a mouth, a patella, and a combination thereof.

According to one embodiment, the source of the tissue is a mammalian donor. According to some embodiments, the tissue comprises a ligament tissue derived from a human donor. According to some embodiments, the human donor is a cadaveric donor. According to some embodiments, the human donor is a living donor.

According to one embodiment, the tissue is a ligament tissue derived from an autologous ligament. According to one embodiment, the tissue is a ligament tissue derived from an allogeneic ligament tissue. According to one embodiment, the tissue is a ligament tissue derived from a xenogeneic ligament tissue.

Mammary Tissue

According to some embodiments, the tissue comprises a mammary tissue derived from a mammary organ or at least one fragment thereof.

According to one embodiment, the source of the tissue is a mammalian donor. According to some embodiments, the tissue is a mammary organ from a human donor. According to some embodiments, the human donor is a cadaveric donor. According to some embodiments, the human donor is a living donor.

According to one embodiment, the tissue is a mammary tissue derived from an autologous mammary organ. According to one embodiment, the tissue is a mammary tissue derived from an allogeneic mammary organ. According to one embodiment, the tissue is a mammary tissue derived from a xenogeneic mammary organ.

Muscle Tissue

According to some embodiments, the tissue comprises a muscle tissue selected from the group consisting of a cardiac muscle tissue, a skeletal muscle tissue, a smooth muscle tissue, and a combination thereof.

According to some embodiments, the tissue is a muscle tissue derived from a muscle tissue-rich organ or at least one fragment thereof.

According to some embodiments, the muscle tissue-rich organ is selected from the group consisting of a gastrointestinal organ, a skeletal organ, a heart, and a combination thereof.

According to one embodiment, the source of the tissue is a mammalian donor. According to some embodiments, the tissue comprises a muscle tissue derived from a human donor. According to some embodiments, the human donor is a cadaveric donor. According to some embodiments, human donor is a living donor.

According to one embodiment, the tissue comprises a muscle tissue derived from an autologous muscle tissue. According to one embodiment, the tissue comprises a muscle tissue derived from an allogeneic muscle tissue. According to one embodiment, the tissue comprises a muscle tissue derived from a xenogeneic muscle tissue.

Nerve Tissue

According to some embodiments, the tissue comprises a nerve tissue derived from a nerve tissue-rich organ or at least one fragment thereof.

According to some embodiments, the nerve tissue-rich organ is selected from the group consisting of a brain, a spinal cord, and a combination thereof.

According to one embodiment, the source of the tissue is a mammalian donor. According to some embodiments, the tissue is a nerve tissue derived from a human donor. According to some embodiments, the human donor is a cadaveric donor.

According to one embodiment, the tissue comprises a nerve tissue derived from an autologous nerve tissue. According to one embodiment, the tissue comprises a nerve tissue derived from an allogeneic nerve tissue. According to one embodiment, the tissue comprises a nerve tissue derived from a xenogeneic nerve tissue.

Placental Tissue

According to some embodiments, the tissue comprises a placental tissue selected from the group consisting of an amnion tissue, a chorion tissue, an umbilical cord tissue, and a combination thereof.

According to some embodiments, the tissue comprises a placental tissue derived from an isolated placental organ or at least one fragment thereof. According to some embodiments, the placental organ is selected from the group consisting of an amnion, a chorion, an umbilical cord, a placenta, and a combination thereof.

According to one embodiment, the tissue comprises a placental tissue derived from an autologous placental tissue. According to one embodiment, the tissue comprises a placental tissue derived from an allogeneic placental tissue. According to one embodiment, the tissue comprises a placental tissue derived from a xenogeneic placental tissue.

According to one embodiment, the tissue is an umbilical cord derived from an autologous umbilical cord. According to one embodiment, the tissue is an umbilical cord tissue derived from an allogeneic umbilical cord. According to one embodiment, the tissue is an umbilical cord tissue derived from a xenogeneic umbilical cord.

Skin Tissue

According to some embodiments, the tissue comprises a skin tissue selected from the group consisting of an epidermal tissue, a dermal tissue, a basement membrane tissue, and a combination thereof.

According to one embodiment, the source of the tissue is a mammalian donor. According to some embodiments, the skin tissue is derived from a human donor. According to some embodiments, the human donor is a cadaveric donor. According to some embodiments, the human donor is a living donor.

According to one embodiment, the tissue comprises a skin tissue derived from an autologous skin tissue. According to one embodiment, the tissue comprises a skin tissue derived from an allogeneic skin tissue. According to one embodiment, the tissue comprises a skin tissue derived from a xenogeneic skin tissue.

Vascular Tissue

The term "vasculature" or "vascular tissue" as used herein refers to the vascular network of a part of the body and its arrangement. The vascular network comprises blood vessels, i.e. any vessel conveying blood: arteries, arterioles, capillaries, venules, and veins. An artery is a relatively thick-walled, muscular pulsating vessel conveying blood away from the heart. A vein is a blood vessel carrying blood toward the heart. Both arteries and veins comprise three layers: the tunica intima, the tunica media and the tunica adventitia. Veins also contain valves that prevent blood backflow. The tunica intima, a single layer of simple squamous endothelial cells glued by a polysaccharide intercellular matrix, surrounded by a thin layer of subendothelial connective tissue interlaced with a number of circularly arranged elastic bands called the internal elastic lamina; a tunica media, comprising circularly arranged elastic fiber, connective tissue,

polysaccharide substances, and a thick elastic band called the external elastic lamina, and the tunica adventitia, entirely made of connective tissue. Capillaries comprise a layer of endothelium and connective tissue.

According to some embodiments, the tissue comprises vascular tissue. According to some embodiments, the vascular tissue is derived from a mammalian donor. According to some embodiments, the vascular tissue is derived from a human donor. According to some embodiments, the vascular tissue is derived from a cadaveric donor. According to some embodiments, the vascular tissue is derived from a living donor.

According to one embodiment, the tissue is a vascular tissue derived from an autologous vascular tissue. According to one embodiment, the tissue is a vascular tissue derived from an allogeneic vascular tissue. According to one embodiment, the tissue is a vascular tissue derived from a xenogeneic vascular tissue.

Matrix Seeded with Tissuegenic Cells

According to some embodiments of the present invention, the matrix is seeded with at least one viable population of tissuegenic cells. The at least one viable population of tissuegenic cells may be derived from one or more of the tissue types from which the matrix may be derived. Such tissue types are identified above with respect to the discussion of the acellular matrix.

According to one embodiment, the at least one viable population of tissuegenic cells is selected from the group consisting of a viable population of pluripotent stem cells, a viable population of mesenchymal stem cells, a viable population of tissue-derived stem cells, and a viable population of tissue-derived progenitor cells.

According to one embodiment, the at least one viable population of tissuegenic cells secretes at least one growth-inductive factor.

According to one embodiment, the at least one viable population of tissuegenic cells can be reprogrammed to at least one viable induced pluripotent stem cell (iPSC) population.

According to one embodiment, the at least one viable population of tissuegenic cells is capable of differentiating into cells of at least one embryonic lineage. According to one embodiment, the embryonic lineage is selected from the group consisting of an ectodermal lineage, a mesodermal lineage and an endodermal lineage.

According to one embodiment, the at least one viable population of tissuegenic cells is capable of regenerating a target tissue. According to one embodiment, the target tissue is selected from the group consisting of an adipose tissue, an amnion tissue, an artery tissue, a bone tissue, a cartilage tissue, a chorion tissue, a colon tissue, a dental tissue, a dermal tissue, a duodenal tissue, an endothelial tissue, an epithelial tissue, a gastrointestinal tissue, a gingival tissue, a growth plate tissue, an intervertebral disc tissue, an intestinal mucosal tissue, an intestinal serosal tissue, a kidney tissue, a ligament tissue, a liver tissue, a lung tissue, a meniscal tissue, a muscle tissue, a nerve tissue, an ovarian tissue, a pancreatic tissue, a parenchymal organ tissue, a pericardial tissue, a periosteal tissue, a peritoneal tissue, a skin tissue, a spleen tissue, a synovial tissue, a tendon tissue, a testes tissue, a urological tissue, a vascular tissue, a vein tissue, and a combination thereof.

According to one embodiment, the at least one viable population of tissuegenic cells is capable of differentiating into a target tissue cell lineage. According to one embodiment, the target tissue cell lineage is selected from the group consisting of an adipose cell lineage, an amnion cell lineage, an artery cell lineage, a bone cell lineage, a cartilage cell lineage, a dental cell lineage, a dermal cell lineage, a duodenal cell lineage, an endothelial lineage, an epithelial cell lineage, a gastrointestinal cell lineage, a growth plate cell lineage, an intervertebral disc cell lineage, an intestinal mucosal cell lineage, an intestinal serosal cell lineage, a kidney cell lineage, a ligament cell lineage, a liver cell lineage, a lung cell lineage, a meniscal cell lineage, a muscle cell lineage, a nerve cell lineage, an ovarian cell lineage, a pancreatic cell lineage, a parenchymal

organ cell lineage, a pericardial cell lineage, a periosteal cell lineage, a peritoneal cell lineage, a skin cell lineage, a spleen cell lineage, a synovial cell lineage, a tendon cell lineage, a testes cell lineage, a urological cell lineage, a vascular cell lineage, a vein cell lineage, and a combination thereof.

According to one embodiment, the at least one viable population of tissuegenic cells derived from adipose tissue differentiates along an osteogenic lineage. According to one embodiment, the at least one viable population of tissuegenic cells derived from adipose tissue differentiates along an adipogenic lineage. According to one embodiment, the at least one viable population of tissuegenic cells derived from adipose tissue differentiates along a chondrogenic lineage. According to one embodiment, the at least one viable population of tissuegenic cells derived from adipose tissue differentiates along a neurogenic lineage.

According to one embodiment, the at least one viable population of tissuegenic cells is capable of migrating from or to the at least one growth-conductive matrix. According to one embodiment, the at least one viable population of tissuegenic cells comprises a viable nonexpanded population of tissuegenic cells. According to one embodiment, the at least one viable population of tissuegenic cells comprises a viable expanded population of tissuegenic cells. According to some embodiments, the at least one viable population of tissuegenic cells adherent to and resident in the endogenous milieu of the growth conductive matrix is immune privileged. The term "immune privileged" as used herein refers to the characteristic of tissuegenic cells by which there is no induction of an immune response upon transplantation of such cells.

Frequency of Tissuegenic Cells

According to some embodiments, the at least one viable population of tissuegenic cells comprise a relative frequency substantially similar to the total cell population of the growth-conductive matrix. According to some embodiments, the at least one viable population of tissuegenic cells comprise a relative frequency substantially higher than the total cell population of the growth-conductive matrix.

According to some embodiments, the at least one viable population of tissuegenic cells comprise at least about at least about 10,000 tissuegenic cells per cc of implant. According to some embodiments, the at least one viable population of tissuegenic cells comprise at least about at least about 20,000 tissuegenic cells per cc of implant. According to some embodiments, the at least one viable population of tissuegenic cells comprise at least about at least about 30,000 tissuegenic cells per cc of implant. According to some embodiments, the at least one viable population of tissuegenic cells comprise at least about at least about 40,000 tissuegenic cells per cc of implant. According to some embodiments, the at least one viable population of tissuegenic cells comprise at least about at least about 50,000 tissuegenic cells per cc of implant.

Growth-inductive Component

According to some embodiments, the matrix further comprises at least one growth-inductive component. According to some such embodiments, the growth-inductive component is at least one cytokine. According to some such embodiments, the at least one growth-inductive component comprises at least one growth factor. According to some such embodiments, the at least one growth factor is fibroblast growth factor-2 (FGF-2). According to some such embodiments, the at least one growth factor is fibroblast growth factor-5 (FGF-5). According to some such embodiments, the at least one growth factor is insulin-like growth factor-1 (IGF-1). According to some such embodiments, the at least one growth factor is transdermal growth factor-beta (TGF-β). According to some such embodiments, the at least one growth factor is bone morphogenic protein-2 (BMP-2). According to some such embodiments, the at least one growth factor is bone morphogenic protein-7 (BMP-7). According to some such embodiments, the at least one growth factor is platelet derived growth factor (PDGF). According to some such embodiments, the at least one growth factor is vascular endothelial growth factor (VEGF). According to some such embodiments, the at least one growth factor is neural epidermal growth-factor-like 1 (NELL-1).

According to some such embodiments, the at least one growth-inductive component is a demineralized bone matrix (DBM). According to some such embodiments, the DBM is demineralized autologous bone. According to some such embodiments, the DBM is demineralized allogeneic bone. According to some such embodiments, the DBM is demineralized xenogenic bone. According to some such embodiments, the DBM is derived by demineralization of cancellous bone. According to some such embodiments the DBM is derived by demineralization of cortical bone (i.e., demineralized cortical bone or DCB). According to some such embodiments, DBM has a residual mineral content of 8% or less (w/w). According to some such embodiments, DBM has a residual mineral content of 5% or less (w/w). According to some such embodiments, DBM has a residual mineral content of 2% or less (w/w). According to some such embodiments, DBM has a residual mineral content of 1% or less (w/w). According to some such embodiments, DBM has a residual mineral content of 0.5% or less (w/w). According to some such embodiments, DBM consists essentially of collagen, non-collagen proteins such as growth factors, and other nonmineral substances found in the original bone, although not necessarily in the original quantities. According to some such embodiments, the demineralized bone is in the form of demineralized bone fibers (e.g., elongated particles of DBM having minimum dimensions on the order of one micron to hundreds of microns and a maximum dimension on the order of one millimeter to hundreds of millimeters).

According to some embodiments, the implant further comprises at least one cryopreservative. According to some such embodiments, the at least one cryopreservative is a solution. According to some such embodiments, the cryopreservative is dimethylsulfoxide (DMSO). According to some such embodiments, the cryopreservative is basal media solution comprising about 5% DMSO. According to some such embodiments, the cryopreservative is basal media solution comprising about 10% DMSO. According to some such embodiments, the cryopreservative is basal media solution comprising about 15% DMSO. According to some such embodiments, the cryopreservative is fetal bovine serum comprising about 5% DMSO. According to some such embodiments, the cryopreservative is fetal bovine serum comprising about 10% DMSO. According to some such embodiments, the cryopreservative is a human

serum comprising about 15% DMSO. According to some such embodiments, the cryopreservative is human serum comprising about 5% DMSO. According to some such embodiments, the cryopreservative is human serum comprising about 10% DMSO. According to some such embodiments, the cryopreservative is ethylene glycol. According to some such embodiments, the cryopreservative is propylene glycol. According to some such embodiments, the cryopreservative is glycerol.

METHOD OF FABRICATING AN ACELLULAR SOFT TISSUE-DERIVED MATRIX

Referring to FIG. 1, according to another aspect, the described invention provides a method of fabricating an implant, the method comprising one or more of the steps of:

(a) isolating a sample of a soft tissue from its source;

(b) pre-processing the soft tissue;

(c) delipidizing the soft tissue;

(d) decellularizing the soft tissue;

(e) disinfecting the soft tissue;

(f) post-processing the soft tissue; and

(g) packaging the soft tissue.

In various embodiments of the disclosed method, some of the aforesaid steps may be omitted, the order of the steps may be varied, or additional steps may be provided. The "soft tissue" of the method may be the soft tissue in the form isolated from the source, the pre-processed soft tissue, the delipidized soft tissue, the decellularized (or acellular) soft tissue, the disinfected soft tissue, the post-processed soft tissue, or the packaged soft tissue. Embodiments of the disclosed method are discussed further hereinbelow, and exemplary embodiments are presented.

1. Isolating step (a): isolating a sample of a soft tissue from its source.

According to some embodiments, isolating step (a) comprises excising the sample of desired soft tissue from its source. According to some embodiments, isolating step (a) comprises removing the sample of desired soft tissue from its source. According to some embodiments, isolating step (a) comprises aspirating the sample of desired soft tissue from its source. According to some embodiments, isolating step (a) comprises recovering the sample of desired source tissue from its source.

According to some embodiments, isolating step (a) comprises separating the sample of desired soft tissue from adjacent tissues of a different type than the desired soft tissue. According to some embodiments, isolating step (a) comprises cutting the adjacent tissues from the sample of desired soft tissue. According to some embodiments, isolating step (a) comprises pulling the adjacent tissues away from the sample of desired soft tissue. According to some embodiments, isolating step (a) comprises scraping the adjacent tissues from the sample of desired soft tissue. According to some embodiments, isolating step (a) comprises separating the adjacent tissues from the sample of desired soft tissue by differential settling of the desired soft tissue and adjacent tissues in a liquid medium.

According to some embodiments, the desired soft tissue is a non-calcified tissue from the mammalian body. According to some embodiments, the desired soft tissue includes one or more of an adipose tissue, an amnion tissue, an artery tissue, a cartilage tissue, a connective tissue, a chorion tissue, a colon tissue, a non-calcified dental tissue, a dermal tissue, a duodenal tissue, an endothelial tissue, an epithelial tissue, a fascial tissue, a gastrointestinal tissue, a gingival tissue, a growth plate tissue, an intervertebral disc tissue, an intestinal mucosal tissue, an intestinal serosal tissue, a ligament tissue, a liver tissue, a lung tissue, a mammary tissue, a membranous tissue, a meniscal tissue, a muscle tissue, a nerve tissue, an ovarian tissue, a parenchymal organ tissue, a pericardial tissue, a periosteal tissue, a peritoneal tissue, a placental tissue, a skin tissue, a spleen tissue, a stomach tissue, a synovial tissue, a tendon

tissue, a testes tissue, an umbilical cord tissue, a urological tissue, a vascular tissue, a vein tissue, and other non-calcified tissues.

According to one embodiment, the source of the desired soft tissue is a mammalian donor. According to one embodiment, the source of the desired soft tissue is a human donor. According to one embodiment, the human donor is a living donor. According to another embodiment, is the human donor is a cadaveric donor. According to yet another embodiment, the tissue donor is the intended recipient of the acellular matrix.

According to one embodiment, the source of the desired soft tissue is a frozen source and the isolating step (a) includes a step of thawing the source.

According to some embodiments, isolating step (a) is performed at a temperature of about 25°C. According to some embodiments, isolating step (a) is performed at a temperature of about 4°C to about 10°C. According to some embodiments, isolating step (a) is performed at an ambient temperature.

According to some embodiments, isolating step (a) comprises reducing the bioburden of the soft tissue before it is isolated. According to some embodiments, isolating step (a) comprises rinsing with a liquid prior to reduce bioburden levels on the surface of the tissue. According to some embodiments, the liquid comprises phosphate buffered saline (PBS). According to some embodiments, the liquid comprises acetic acid. According to some embodiments, the liquid comprises peracetic acid.

2. Pre-processing step (b): pre-processing the sample of soft tissue.

According to some embodiments, pre-processing step (b) includes size reduction of the sample of soft tissue. According to some embodiments, pre-processing step (b) comprises cutting the sample of soft tissue into strips. According to some embodiments, pre-processing step (b) comprises slicing the sample of soft tissue. According to some embodiments, pre-processing step (b) comprises cutting the sample of soft tissue into chunks. According to some embodiments, pre-processing step (b) comprises mincing the sample of soft tissue. According to some embodiments, pre-processing step (b)

comprises grinding the sample of soft tissue. According to some embodiments, the sample of soft tissue is ground using a coarse plate. According to some embodiments, the sample of soft tissue is ground using a fine plate. According to some embodiments, separating step (b) comprises milling the sample of desired soft tissue. According to some embodiments, pre-processing step (b) comprises homogenizing the sample of soft tissue. According to some embodiments, pre-processing step (b) comprises separating components of the sample of soft tissue by differential settling of the components of the soft tissue.

According to some embodiments, pre-processing step (b) is performed at a temperature of about 25°C. According to some embodiments, pre-processing step (b) is performed at a temperature of about 4°C to about 10°C. According to some embodiments, pre-processing step (b) is performed at an ambient temperature. According to some embodiments, pre-processing step (b) is performed at a temperature greater than an ambient temperature. According to some embodiments, pre-processing step (b) is performed at a physiological temperature of a living mammal. According to some embodiments, pre-processing step (b) is performed at a temperature of about 37°C.

3. Delipidizing step (c): delipidizing the sample of soft tissue.

According to some embodiments, delipidizing step (c) is a step of removing lipids from the sample of soft tissue. Some disruption of cellular membranes and removal of cells may also occur. According to some embodiments, delipidizing step (c) comprises removing some of the lipids native to the soft tissue. According to some embodiments, delipidizing step (c) comprises removing most of the lipids native to the soft tissue. According to some embodiments, delipidizing step (c) comprises removing substantially all of the lipids native to the soft tissue. According to some embodiments, delipidizing step (c) removes substantially all of the lipids native to the soft tissue. According to some embodiments, delipidizing step (c) disrupts cellular membranes of cells resident in the soft tissue. According to some embodiments, delipidizing step (c) removes cellular components from the soft tissue. According to some embodiments, delipidizing step (c)

is performed after decellularization step (d). According to some embodiments, multiple delipidizing steps are performed. According to some embodiments, delipidizing step (c) is not performed.

According to some embodiments, delipidizing step (c) comprises contacting the soft tissue with a liquid so as to separate lipids from the soft tissue. According to some embodiments, delipidizing step (c) comprises immersing the soft tissue in the liquid. According to some embodiments, delipidizing step (c) comprises soaking the soft tissue in the liquid. According to some embodiments, delipidizing step (c) comprises mechanically agitating the soft tissue in the liquid. According to some embodiments, delipidizing step (c) comprises blending the soft tissue in the liquid. According to some embodiments, blending includes a step of mixing the soft tissue in the liquid under conditions of high shear. According to some embodiments, blending includes a step of mixing the soft tissue in the liquid using at least one rotating blade rotating at a rate in the range of from about 1,000 rpm to about 20,000 rpm. According to some embodiments, delipidizing step (c) comprises homogenizing the soft tissue in the liquid. According to some embodiments, homogenization includes a step of mixing the soft tissue in the liquid such that the tissue is evenly distributed throughout the liquid.

According to some embodiments, the liquid is water. According to some embodiments, the liquid is an organic solvent. According to some embodiments, the liquid is a mixture of organic solvents. According to some embodiments, the liquid is a mixture of one or more organic solvents and water. According to some embodiments, the organic solvent is selected from a group consisting of a paraffin, an aromatic hydrocarbon, a cyclic hydrocarbon, a chlorinated hydrocarbon, a fluorinated hydrocarbon, a chlorinated methane, a fluorinated methane, an alcohol, an ether, a ketone, an organic acid, an aldehyde, an ester, and combinations thereof. According to some embodiments, the organic solvent has one carbon atom. According to some embodiments, the organic solvent has two carbon atoms. According to some embodiments, the organic solvent has three carbon atoms. According to some embodiments, the organic solvent has four carbon atoms. According to some

embodiments, the organic solvent has five carbon atoms. According to some embodiments, the organic solvent has six carbon atoms.

According to some embodiments, the liquid includes an organic acid. According to some embodiments, the liquid includes a mineral acid. According to some embodiments, the liquid includes an organic base. According to some embodiments, the liquid includes a mineral base. According to some embodiments, the liquid includes an organic salt. According to some embodiments, the liquid contains a mineral salt.

According to some embodiments, delipidizing step (c) comprises recovering a lipid layer, which may be a mixture of lipid and the aforesaid liquid, from the soft tissue. According to some embodiments, delipidizing step (c) comprises recovering the lipid layer by differential settling. According to some embodiments, delipidizing step (c) comprises recovering the lipid layer by centrifugation. According to some embodiments, delipidizing step (c) comprises recovering the lipid layer by filtration. According to some embodiments, delipidizing step (c) comprises recovering the lipid layer by decantation.

According to some embodiments, delipidizing step (c) comprises recovering the delipidized tissue. According to some embodiments, delipidizing step (c) comprises recovering the delipidized tissue by differential settling. According to some embodiments, delipidizing step (c) comprises recovering the delipidized tissue by centrifugation. According to some embodiments, delipidizing step (c) comprises recovering the delipidized tissue by filtration. According to some embodiments, delipidizing step (c) comprises recovering the delipidized tissue by decantation.

According to some embodiments, delipidization step (c) comprises contacting the soft tissue with a supercritical fluid (e.g., supercritical carbon dioxide). According to some embodiments, delipidization step (c) comprises recovering the lipid by evaporation of the supercritical fluid.

According to some embodiments, delipidization step (c) is performed at a temperature of about 25°C. According to some embodiments, delipidization step (c) is performed at an ambient temperature. According to some embodiments, delipidization

step (c) is performed at a temperature greater than an ambient temperature. According to some embodiments, delipidization step (c) is performed at a physiological temperature of a living mammal. According to some embodiments, delipidization step (c) is performed at a temperature of about 37°C.

4. Decellularizing step (d): decellularizing the sample of soft tissue.

According to some embodiments, decellularization step (d) comprises a step of removing cells and cell fragments from a sample of soft tissue. According to some embodiments, decellularization step (d) converts the soft tissue to an acellular matrix of ECM. According to some embodiments, the acellular matrix is essentially free of cell fragments. According to some embodiments, the acellular matrix is entirely free of cell fragments. According to some embodiments, the acellular matrix is free of native tissuegenic factors. According to some embodiments, the acellular matrix includes native tissuegenic factors.

According to some embodiments, decellularization step (d) comprises contacting the sample of soft tissue with a decellularizing solution. According to some embodiments, decellularization step (d) comprises contacting the soft tissue with a decellularizing solution so as to disrupt the cells and remove cells and cell fragments from the tissue. According to some embodiments, decellularization step (d) comprises immersing the soft tissue in the decellularizing solution. According to some embodiments, decellularization step (d) comprises soaking the soft tissue in the decellularizing solution. According to some embodiments, decellularization step (d) comprises mechanically agitating the soft tissue in the decellularization solution. According to some embodiments, decellularization step (d) comprises blending the soft tissue in the decellularization solution. According to some embodiments, blending includes a step of mixing the soft tissue in the decellularization solution under conditions of high shear. According to some embodiments, blending includes a step of mixing the soft tissue with the decellularization solution using at least one rotating blade rotating at a rate in the range of from about 1,000 rpm to about 20,000 rpm. According to some embodiments, decellularization step (d) comprises homogenizing the soft tissue in the

decellularization solution. According to some embodiments, homogenization includes a step of mixing the soft tissue in the decellularization solution such that the tissue is evenly distributed throughout the liquid. According to some embodiments, decellularization step (d) comprises multiple decellularization steps. According to some embodiments, decellularization step (d) is performed before a delipidization step.

According to some embodiments, the decellularization solution is hypertonic relative to the interior of the cells. According to some embodiments, the decellularization solution is hypotonic relative to the interior of the cells. According to some embodiments, the decellularization solution includes a salt. According to some embodiments, the decellularization solution is a salt solution. According to some embodiments, the salt is sodium chloride. According to some embodiments, the decellularization solution is a pH-buffered solution. According to some embodiments, the pH-buffered solution has a physiological pH. According to some embodiments, the pH-buffered solution has a pH of about 7.4.

According to some embodiments, the decellularization solution includes a detergent, emulsifier, or surfactant. According to some embodiments, the detergent, emulsifier, or surfactant includes a derivative of a long chain fatty acid. According to some embodiments, the detergent, emulsifier, or surfactant includes sodium deoxycholate. According to some embodiments, the detergent, emulsifier, or surfactant includes sodium lauryl sulfate. According to some embodiments, the detergent, emulsifier, or surfactant includes sodium dodecyl sulfate. According to some embodiments, the detergent, emulsifier, or surfactant includes a non-ionic surfactant. According to some embodiments, the detergent, emulsifier, or surfactant includes a polyoxyethylene derivative of a long-chain fatty acid. According to some embodiments, the detergent, emulsifier, or surfactant includes a polyoxyethylene sorbitan monolaurate. According to some embodiments, the detergent, emulsifier, or surfactant includes a polyoxyethylene derivate of an aromatic hydrocarbon.

According to some embodiments, the concentration of the detergent, emulsifier, or surfactant is present in a solvent in a concentration in the range of from about 0.1%

to about 5.0% (w/v). According to some embodiments, the solvent includes water. According to some embodiments, the solvent includes an organic solvent. According to some embodiments, the solvent includes a mixture of water and an organic solvent. According to some embodiments, the solvent includes less than 20% organic solvent by volume. According to some embodiments, the solvent includes from about 20% about 40% organic solvent by volume. According to some embodiments, the solvent includes from about 40% to about 60% organic solvent by volume. According to some embodiments, the solvent includes from about 60% to about 80% organic solvent by volume. According to some embodiments, the solvent includes more than 80% organic solvent by volume.

According to some embodiments, the organic solvent is selected from a group consisting of a paraffin, an aromatic hydrocarbon, a cyclic hydrocarbon, a chlorinated hydrocarbon, a fluorinated hydrocarbon, a chlorinated methane, a fluorinated methane, an alcohol, an ether, a ketone, an aldehyde, an ester, an organic acid, and combinations thereof. According to some embodiments, the organic solvent has one carbon atom. According to some embodiments, the organic solvent has two carbon atoms. According to some embodiments, the organic solvent has three carbon atoms. According to some embodiments, the organic solvent has four carbon atoms. According to some embodiments, the organic solvent has five carbon atoms. According to some embodiments, the organic solvent has six carbon atoms.

According to some embodiments, the decellularization solution includes an enzyme. According to some embodiments, the decellularization solution includes a lipase. According to some embodiments, the decellularization solution includes a collagenase. According to some embodiments, the decellularization solution includes trypsin. According to some embodiments, the decellularization solution includes an endonuclease. According to some embodiments, the decellularization solution includes protease. According to some embodiments, the decellularization solution includes a protease inhibitor.

According to some embodiments, the decellularization solution is mildly alkaline. According to some embodiments, the decellularization solution is mildly acidic. In some embodiments, the decelluarization solution has a pH that is less than 6. According to some embodiments, the decellularization solution has a pH in the range of about 6 to about 8. In some embodiments, the decellularization solution has a pH that is greater than 10. According to some embodiments, the decellularization solution includes peracetic acid.

According to some embodiments, the soft tissue is in contact with the decellularization solution for at least 6 hours. According to some embodiments, the soft tissue is in contact with the decellularization solution for at least 12 hours. According to some embodiments, the soft tissue is in contact with the decellularization solution for at least 18 hours. According to some embodiments, the soft tissue is in contact with the decellularization solution for at least 24 hours. According to some embodiments, the soft tissue is in contact with the decellularization solution for at least 36 hours. According to some embodiments, the soft tissue is in contact with the decellularization solution for at least 48 hours.

According to some embodiments, decellularization step (d) comprises a step of scraping a cellular layer from a basement membrane of the soft tissue.

According to some embodiments, decellularization step (d) is performed at a temperature of about 25°C. According to some embodiments, decellularization step (d) is performed at an ambient temperature. According to some embodiments, decellularization step (d) is performed at a temperature greater than an ambient temperature. According to some embodiments, decellularization step (d) is performed at a physiological temperature of a living mammal. According to some embodiments, decellularization step (d) is performed at a temperature of about 37°C.

5. Disinfection step (e): disinfecting the soft tissue.

According to some embodiments, disinfection step (e) comprises disrupting and/or removing micro-organisms in the soft tissue. According to some embodiments, disinfection step (e) comprises disrupting and/or removing viruses in the soft tissue.

According to some embodiments, disinfection step (e) comprises contacting the soft tissue with a disinfecting solution. According to some embodiments, disinfection step (e) comprises immersing the soft tissue in the disinfecting solution. According to some embodiments, disinfection step (e) comprises soaking the soft tissue in the disinfecting solution. According to some embodiments, disinfection step (e) comprises mechanically agitating the soft tissue in the disinfecting solution. According to some embodiments, disinfection step (e) comprises blending the soft tissue in the disinfecting solution. According to some embodiments, blending includes a step of mixing the soft tissue in the disinfecting solution under conditions of high shear. According to some embodiments, blending includes a step of mixing the soft tissue in the disinfecting solution using at least one rotating blade rotating at a rate in the range of from about 1,000 rpm to about 20,000 rpm.

According to some embodiments, the disinfecting solution includes an antibiotic. According to some embodiments, the disinfecting solution includes more than one antibiotic. According to some embodiments, the disinfecting solution includes an alcohol. According to some embodiments, the disinfecting solution includes a glycol. According to some embodiments the disinfecting solution includes a mixture or water with an alcohol and/or a glycol.

According to some embodiments, the disinfecting solution includes a peroxy compound. According to some embodiments, the disinfecting solution includes peracetic acid. According to some embodiments, the disinfecting solution includes chlorine dioxide. According to some embodiments, the disinfecting solution includes a detergent or surfactant. According to some embodiments, the disinfecting solution includes an ethylene diamine salt (e.g., ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)). According to some embodiments, the disinfecting solution includes a protein denaturant.

According to some embodiments, the disinfecting solution includes a chaotropic salt (e.g., guanidine isothiocyanate).

According to some embodiments, the soft tissue is in contact with the disinfecting solution for at least 1 hour. According to some embodiments, the soft tissue is in contact with the disinfecting solution for at least 2 hours. According to some embodiments, the soft tissue is in contact with the disinfecting solution for at least 4 hours.

According to some embodiments, disinfection step (e) comprises exposing the soft tissue to ionizing radiation.

According to some embodiments, disinfection step (e) is performed at a temperature of about 25°C. According to some embodiments, disinfection step (e) is performed at an ambient temperature. According to some embodiments, disinfection step (e) is performed at a temperature greater than an ambient temperature. According to some embodiments, disinfection step (e) is performed at a physiological temperature of a living mammal. According to some embodiments, disinfection step (e) is performed at a temperature of about 37°C.

According to some embodiments, disinfection step (e) is performed at a pH in the range of from about 2 to about 8, such that said soft tissue forms a flowable gel. According to some embodiments, disinfection step (e) is performed at a pH in the range of about 4 to about 8 such that said soft tissue forms a flowable gel. According to some embodiments, disinfection step (e) is performed at a pH below the isoelectric point of collagen.

According to some embodiments, the disinfected soft tissue is washed with water to remove the disinfecting solution from the disinfected soft tissue. According to some embodiments, the disinfected soft tissue is washed with a buffer solution to remove the disinfecting solution from the disinfected soft tissue. According to some embodiments, the disinfected soft tissue is washed with a physiological buffer to remove the disinfecting solution from the disinfected soft tissue and bring the disinfected tissue to a physiological pH. According to some embodiments, the disinfected soft tissue is

washed with a solution containing a volatile polar solvent to remove the disinfecting solution from the disinfected soft tissue.

6. Post-processing step (f): post-processing the soft tissue.

According to some embodiments, post-processing step (f) comprises forming the soft tissue into a final physical form. According to some embodiments, the final physical form of the soft tissue is a sheet. According to some embodiments, the final physical form of the soft tissue is particulate. According to some embodiments, the final physical form of the soft tissue is a paste, gel, slurry, or suspension. According to some embodiments, the final physical form of the soft tissue is a dried, pre-formed block. According to some embodiments, the final physical form of the soft tissue is porous. According to some embodiments, the final physical form of the implant is fibrous.

According to some embodiments, post-processing step (f) comprises cutting the soft tissue to a final shape. According to some embodiments, post-processing step (f) comprises perforating the soft tissue. According to some embodiments, post-processing step (f) includes air-drying the soft tissue. According to some embodiments, post-processing step (f) includes drying the soft tissue while heating the soft tissue. According to some embodiments, post-processing step (f) includes lyophilizing the soft tissue. According to some embodiments, post-processing step (f) includes size reduction of the soft tissue. According to some embodiments, post-processing step (f) includes milling the soft tissue. According to some embodiments, post-processing step (f) includes freezer-milling the soft tissue (i.e., milling the soft tissue while it is in a frozen state, for example, by impact milling). According to some embodiments, post-processing step (f) includes freeze-fracturing the soft tissue. According to some embodiments, post-processing step (f) includes compressing the soft tissue.

According to some embodiments, post-processing step (f) comprises rehydrating the dried soft tissue. According to some embodiments, post-processing step (f) comprises combining particulate soft tissue with a carrier. According to some embodiments, the carrier includes at least one of an isotonic solution, a sodium chloride solution, lactated Ringer's solution, a phosphate-buffered saline solution (PBS), platelet

rich plasma (PRP), hyaluronic acid (HA) or a derivative thereof, and sodium hyaluronate. According to some embodiments, the carrier is a sodium chloride solution at a concentration of about 0.1% to about 1%. According to some such embodiments, the sodium chloride solution is at a concentration of about 0.9%. According to some embodiments, the carrier comprises thrombin. According to some embodiments, the carrier comprises fibrin. According to some embodiments, the carrier comprises glycerin. According to some embodiments, the carrier comprises collagen. According to some embodiments, the carrier comprises lecithin. According to some embodiments, the carrier comprises a sugar. According to some embodiments, the carrier comprises a polysaccharide. According to some embodiments, post-processing step (f) comprises mixing particulate soft tissue with a carrier on site for immediate administration to a patient.

According to some embodiments, the particulate soft tissue is mixed with a carrier such that the particulate soft tissue and carrier combine to form a flowable gel. According to some embodiments, the mixing step is performed at a pH in the range of from about 2 to about 8. According to some embodiments, the mixing step is performed at a pH in the range of about 4 to about 8. According to some embodiments, the mixing step is performed at a pH below the isoelectric point of collagen.

According to some embodiments, the particulate soft tissue is mixed with a carrier such that the particulate soft tissue and the carrier form a paste. According to some embodiments, the carrier includes a polymer such that the particulate soft tissue and the polymer form a paste. According to some embodiments, the polymer is selected from the group consisting of polysaccharides, nucleic acids, carbohydrates, proteins, polypeptides, poly(α-hydroxy acids), poly(lactones), poly(amino acids), poly(anhydrides), poly(orthoesters), poly(anhydride-co-imides), poly(orthocarbonates), poly(α-hydroxy alkanoates), poly(dioxanones), poly(phosphoesters), poly(L-lactide) (PLLA), poly(D,L-lactide) (PDLLA), polyglycolide (PGA), poly(lactide-co-glycolide (PLGA), poly(L-lactide-co-D, L-lactide), poly(D,L-lactide-co-trimethylene carbonate), polyhydroxybutyrate (PHB), poly(ε-caprolactone), poly(δ-valerolactone), poly(γ-butyrolactone), poly(caprolactone), polyacrylic acid, polycarboxylic acid, poly(allylamine

hydrochloride), poly(diallyldimethylammonium chloride), poly(ethyleneimine), polypropylene fumarate, polyvinyl alcohol, polyvinylpyrrolidone, polyethylene, polymethylmethacrylate, carbon fibers, poly(ethylene glycol), poly(ethylene oxide), poly(vinyl alcohol), poly(vinylpyrrolidone), poly(ethyloxazoline), poly(ethylene oxide)-co-poly(propylene oxide) block copolymers, poly(ethylene terephthalate)polyamide, and copolymers thereof.

According to some embodiments, post-processing step (f) comprises characterizing the acellular matrix. According to some embodiments, post-processing step (f) comprises characterizing the acellular matrix for DNA content, wherein absence of detectable amounts of DNA indicates the absence of intact cells and cellular components from the soft tissue. According to some embodiments, post-processing step (f) comprises characterizing the acellular matrix for the presence of growth factors. According to some embodiments, post-processing step (f) comprises determining the particle size distribution of particulate acellular matrix. According to some embodiments, most of the particles have surface areas of 625 square microns or less. According to some embodiments, at least 80% of the particles have surface areas of 625 square microns or less.

7. Packaging step (g): packaging the soft tissue.

According to some embodiments, packaging step (g) comprises preparing the soft tissue for storage and subsequent use. According to some embodiments, packaging step (g) comprises immersing the soft tissue in a preservative solution. According to some such embodiments, the preservative solution is aqueous ethanol. According to some such embodiments, packaging step (g) comprises freezing the soft tissue for storage. According to some embodiments, packaging step (g) comprises packaging the soft tissue in a dried or lyophilized state.

According to some embodiments, the soft tissue is in a dried or lyophilized particulate form, and packaging step (g) comprises packaging the dried or lyophilized tissue in a sterile container. According to some such embodiments, packaging step (g) comprises freezing the dried or lyophilized tissue for storage. According to some

embodiments, packaging step (g) comprises storing the dried or lyophilized tissue at temperatures between 4°C and an ambient temperature.

According to some embodiments, the soft tissue is packaged while in a frozen state. According to some embodiments, the soft tissue is provided in a frozen state, and then thawed before packaging. According to some embodiments, the soft tissue is not in a frozen state when provided, and is packaged while in the state in which it is provided.

8. Addition of Tissuegenic Cells

According to some embodiments, the method of fabricating an implant further comprises adding tissuegenic cells to the decellularized soft tissue. Implants with added tissuegenic cells are discussed elsewhere above. Such tissuegenic cells or implants with added tissuegenic cells may be cryopreserved.

Cryopreservation is used for the long-term preservation of various tissues and cells. According to some embodiments, tissuegenic cells derived from a tissue can be cryopreserved, reconstituted, and seeded onto an isolated matrix. According to some embodiments, tissuegenic cells derived from a tissue can be cryopreserved, reconstituted, and seeded onto an isolated matrix to promote tissuegenesis in vitro and in vivo.

Detrimental effects of ice crystal formation and increased solute concentration in cryopreserved cells can be reduced by using cryoprotective additives or chemicals that protect cells during freezing. Commonly used cryoprotective agents include, but are not limited to, dimethylsulfoxide (DMSO), ethylene glycol, propylene glycol, 2-Methyl-2.4-pentanediol (MPD), sucrose, and glycerol. Examples of cryopreservation solutions that can be used in preserving a tissue or a matrix include, but are not limited to, a commercially available basal media solution such as, Mesencult (Stem Cell Technologies), or Hyclone AdvanceStem, Fetal Bovine Serum with 5-15% DMSO, Bovine Serum Albumin with 5-15% DMSO, Human Serum Albumin with 5-15% DMSO,

Aedesta (Cell Preservation Solutions), LiforCell (Lifeblood Medical), ethylene glycol, propylene glycol, and glycerol.

According to some embodiments, the packaged implant can be preserved for an extended period of time by slowly cooling the packaged implant in the presence of a cryoprotective agent and by storing at ultra-low temperatures. According to some such embodiments, packaging step (g) comprises freezing the soft tissue implant to at least a temperature of -80°C. According to some such embodiments, packaging step (g) comprises freezing the soft tissue implant at a controlled freezing rate. According to some such embodiments, the controlled freezing rate is a controlled freezing rate of about 0.5°C per minute to about 10°C per minute. According to some such embodiments, the controlled freezing rate is a controlled freezing rate of about 1°C per minute until about -100°C.

9. Addition of Growth-Inductive Components

According to some embodiments, the method of fabricating an implant further comprises supplementing the decellularized soft tissue with at least one growth-inductive component. According to some such embodiments, the at least one growth-inductive component includes one or more of a demineralized cortical bone, fibroblast growth factor-2 (FGF-2), fibroblast growth factor-5 (FGF-5), insulin-like growth factor 1 (IGF-1), transforming growth factor beta (TGF-β), bone morphogenic protein-2 (BMP-2), bone morphogenic protein-7 (BMP-7), platelet-derived growth factor (PDGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), neural epidermal growth-factor-like 1 (NELL-1), and a cytokine.

According to one embodiment, the at least one growth-inductive component is tissue-derived. According to one embodiment, the at least one growth-inductive component comprises inducible pluripotent stem cells (iPSCs). According to one embodiment, the at least one growth-inductive component originates from a component of the tissue-derived growth-inductive component other than cells. According to one embodiment, tissuegenic cells added to the decellularized soft tissue secrete the at least one growth-inductive component. According to one embodiment, the growth-

inductive component comprises a growth medium derived from expanded tissuegenic cells.

According to some embodiments, the tissue is rinsed with a liquid prior to being separated into pieces to reduce bioburden levels on the surface of the tissue. According to some embodiments, the liquid comprises phosphate buffered saline (PBS). According to some embodiments, the liquid comprises acetic acid. According to some embodiments, the liquid comprises peracetic acid.

EXAMPLES

The following examples are put forth so as to provide those of ordinary skill in the art with a complete disclosure and description of exemplary embodiments of the described invention, and are not intended to limit the scope of what the inventors regard as their invention nor are they intended to represent that the experiments below are all or the only experiments performed. Efforts have been made to ensure accuracy with respect to numbers used (e.g., amounts, temperatures, etc.) but some experimental errors and deviations should be accounted for. Unless indicated otherwise, parts are parts by weight, molecular weight is weight average molecular weight, temperature is in degrees centigrade (°C), and pressure is at or near atmospheric. Although the exemplary embodiments are adapted to specific soft tissues, it will be recognized by those skilled in the art that the methods described herein can be readily adapted to other soft tissues. Adipose, dermis, fascia, muscle, pericardium, and other connective or membranous tissues are among the soft tissues that may be processed according to the processes of the exemplary methods, or variations thereof.

I. SOURCE TISSUE: ADIPOSE TISSUE

Acellular matrices derived from adipose tissue may be in a bulk form, particulate form, or other forms. Such acellular matrices may be used as bulking agents for cosmetic or reconstructive purposes. Some specific applications include use as a bulking agent for to restore natural contours where native adipose tissue has been removed, or damaged by injury or wasting, or to correct naturally-occuring asymmetries.

In such instances, the acellular matrices may also be used to stimulate adipose regeneration and natural integration of the regenerated tissues. The acellular matrices may also be used to deliver precursor cells and/or tissuegenic factors for repair or regeneration of adipose tissue or other tissue types. The foregoing summary of uses is intended to be representative, and not to limit the range of uses for acellular adipose-derived matrices according to embodiments of the present invention.

EXAMPLE 1: Decellularization with Sodium Deoxycholate

Adipose tissue is recovered aseptically from a cadaveric donor. Any muscle, fascia, or other tissues attached to the adipose tissue, if present, are cut away. Equal portions of the adipose tissue are measured into empty flasks and washed by agitation in deionized water, at a ratio of about 1000 ml of water to 500 gm of tissue. After a period of time sufficient to remove blood and loose tissue from the adipose tissue, the water is drained from the flask, while collecting the adipose tissue in a 212 µm to 300 µm sieve. After the water is drained, the adipose tissue is returned to the flask.

Following the washing step, the adipose tissue is soaked with mechanical agitation in a 4% solution of sodium deoxycholate, at a ratio of about 1000 mL deoxycholate solution to 500 gm of adipose tissue. After a period of time sufficient to disrupt and remove the adipocytes and other cells from the adipose tissue, the deoxycholate solution is drained from the flask, while collecting the adipose tissue in a 212 µm to 300 µm sieve. After the deoxycholate solution is drained, the adipose tissue is returned to the flask, and rinsed repeatedly in deionized water to remove any residual deoxycholate from the tissue. After each rinse, the water is drained from the flask, as described above, and the collected adipose tissue is returned to the flask.

Following the last water rinse, the adipose tissue is soaked in a sterilizing solution with mechanical agitation. One suitable sterilizing solution would be 0.5% to 1.0% peracetic acid in deionized water. One or more additional soaks in sterilizing solution may be needed to adequately sterilize the adipose tissue. After the final sterilizing soak, the adipose tissue is rinsed repeatedly in deionized water to remove any traces of sterilizing solution from the tissue.

Following the final water rinse, the adipose tissue is stored under refrigeration or frozen, or it is subjected to further processing steps, such as delipidization.

EXAMPLE 2: Decellularization with a Hypertonic Solution

A sample of adipose tissue is measured into a flask and a hypertonic solution (e.g., 1M NaCl) is added in a 2:1 ratio. The mixture is agitated for at least 12 hours at an ambient temperature. After agitation, the hypertonic solution is decanted, and the adipose tissue is captured in a 212 µm to 300 µm sieve. The recovered adipose tissue is returned to the flask, and soaked in an 0.1% surfactant solution with agitation for at least 12 hours at ambient temperature.

Following the last water rinse, the adipose tissue is soaked in a sterilizing solution, with agitation. One suitable sterilizing solution would be 0.5% to 1.0% peracetic acid in a mixture of water, ethanol, and propylene glycol. One or more additional soaks in sterilizing solution may be needed to adequately sterilize the adipose tissue. After the final sterilizing soak, the adipose tissue is rinsed repeatedly in deionized water to remove any traces of sterilizing solution from the tissue.

Following the final water rinse, the adipose tissue is stored under refrigeration or frozen, or it is subjected to further processing steps, such as delipidization.

EXAMPLE 3: Removal of Lipids from an Adipose Tissue

A sample of adipose tissue, which may be decellularized or untreated, is collected and a size reduction, such as grinding or mincing, is performed. At a temperature of ambient or greater, the adipose tissue is placed in a conical tube or beaker, and homogenized. The homogenized tissue is then centrifuged to separate lipid and water layers from the tissue, taking care not to lose the floating tissue layer.

EXAMPLE 4: Delipidization of an Adipose Tissue

A sample of adipose tissue, which may be decellularized or untreated, is collected and a size reduction, such as grinding or mincing, is performed. After size

reduction, the adipose tissue may be processed as described in Example 2, then delipidized as follows.

The adipose tissue is equally divided among a number of conical tubes, and an organic solvent (e.g., an alcohol) is added to the tube. Surfactants (e.g., Triton X-100 or Tween 80) may also be added to promote lipid removal. The alcohol/tissue mixture is rapidly homogenized at a temperature of ambient or greater, and the homogenized mixture is centrifuged to separate lipid, solvent, water and tissue layers. The lipid and solvent layers are removed from the tube, and the tissue is recovered. The solvent homogenization step is repeated for a number of times sufficient to remove all of the lipid from the tissue.

After the final solvent treatment, the tissue is homogenized with water, and the water is separated from the tissue by centrifugation. These steps may be repeated a number of times to remove the final traces of alcohol. The homogenate may be incubated before it is centrifuged. A final PBS wash may be performed. Removal of the lipids from the tissue can be verified by any of a number of well-known lipid assays.

EXAMPLE 5: Fabrication of an Acellular Implant

A sample of adipose-rich soft tissue is obtained from a suitable donor. The tissue is inspected for muscle and dermis, which is then cut away from the adipose tissue. Size reduction is then performed by grinding or mincing the adipose tissue, or by another suitable method.

The adipose tissue is then delipidized by the method of Example 3, or by the method described herein. The adipose tissue is divided between a number of centrifuge tubes and a small amount of water is added to each tube to wet the tissue. The tissue is warmed to a temperature above ambient, and centrifuged to separate a lipid layer from the tissue. A lipid layer, a water layer, an adipose layer, and bottom pellet are formed.

The adipose layer is recovered and blended with an equal portion of an alcohol, or alcohol with surfactants or detergents (e.g., Triton X-100 or Tween 80), then returned to the centrifuge tube. The mixture of adipose tissue and alcohol is centrifuged to

separate the mixture into layers of lipid, alcohol, and adipose tissue. The adipose tissue is then recovered. The alcohol treatment may be repeated a number of times to remove all of the lipid from the tissue.

After the final alcohol treatment, the adipose tissue is soaked in a hypertonic solution (e.g., 1M NaCl) with agitation for at least 6 hours at ambient temperature. The tissue and hypertonic solution may be blended before the soaking step begins. After soaking in hypertonic solution, the adipose tissue is recovered from the mixture by centrifugation at a temperature above ambient, and soaked in a dilute detergent or surfactant solution with agitation for at least 12 hours at ambient temperature. One suitable solution would have at least 0.1% of a surfactant in water. After soaking in the detergent, the adipose tissue is recovered by centrifugation, and rinsed at least twice in deionized water.

After the water rinse, the recovered adipose tissue is suspended in a disinfecting solution, and allowed to soak with agitation. One suitable disinfection solution would be between 0.5% and 1% peracetic acid in a mixture of water, ethanol, and propylene glycol. The adipose tissue is then recovered by centrifugation, and subjected to multiple water rinses to remove any remaining disinfecting solution.

The rinsed adipose tissue is then dried and milled to a particulate form. Drying may be performed by lyophilization. The dried adipose tissue may be further milled in a frozen state (impact milling, or freezer-milling) to further reduce the particle sizes of the tissue, and produce a flowable particulate tissue. Suitable milling protocols are known in the art.

The particulate tissue may be packaged in a sterile container for later use, or thawed and rehydrated immediately. In one rehydration method, a desired amount of the thawed particulate tissue is added to a first syringe. The desired amount of fluid (e.g., a carrier) is added to a second syringe, and the syringes are attached to each other using a female-to-female locking cap. The fluid is ejected slowly into the tissue-filled syringe, while depressing the plungers of both syringes. The entirety of the mixture of tissue and fluid is transferred to one of the syringes, and the other is discarded. The

syringe containing the mixture is stoppered and packaged in foil and/ora Kapak® pouch (Kapak Corporation, St. Louis Park, MN).

EXAMPLE 6: Fabrication of an Implant by Reseeding Adipose-Derived Stem Cells on a Decellularized Matrix

Adipose tissue with its endogenous stem cell niche is recovered aseptically from a cadaveric donor within 24 hours post mortem or from living donors undergoing elective liposuction surgery. For example, visceral fat can be excised from cadaveric donors or obtained with consent from living donors undergoing elective procedures, such as liposuction, from body regions rich in adipose, for example, hip, thigh and abdomen. Subcutaneous adipose can be procured from the hypodermis by dissecting it out from full thickness skin excised from cadaveric donor. Adipose tissue from infrapatellar fat pads can be dissected out during recovery of knee en-bloc from a cadaveric donor. The adipose tissue is stored at 4°C until ready for processing. Generally, tissue processing commences within 72 hours post-mortem. The adipose tissue is exposed to a bioburden reducer to generate preprocessed adipose tissue. The preprocessed adipose tissue is subjected to a series of PBS soaks with agitation. The preprocessed agitated adipose tissue is then chopped into small pieces approximately 0.5 x 0.5 x 0.5 cm. The chopped adipose pieces are then subjected to a series of rinses with cold PBS. The pH of the rinseate is at or near physiological pH at the end of the rinse. The rinseate is divided into two batches for stem cell isolation and decellularized matrix preparation.

Isolation of ASCs

Viable adipose-derived stem cells (ASCs) are isolated according to established protocols (Young et al., 2011, Acta Biomaterialia, 7: 1040-1049). Briefly, following rinses with a buffered saline solution (e.g., 0.01M PBS, pH 7.4), one batch of the rinsed tissue is digested with a dissociation agent (e.g., collagenase) in order to disperse the tissue while maintaining cell viability. The digest is subjected to centrifugation to separate the stromal vascular fraction (SVF) rich in adipose-derived stem cells from the supernatant rich in lipid filled adipocytes and matrix. The supernatant is aspirated and the aspirate is frozen at -80 °C until further use. The SVF pellet is resuspended in PBS

washing solution and is subjected to a series of cold PBS washes with alternating steps of centrifugation. Following the final wash and resuspension in PBS, the resuspended solution is subjected to filtration to remove undigested tissue and to obtain isolated SVF enriched with ASCs for seeding. Alternatively, ASCs can be isolated from the other cells present in digested adipose tissue on the basis of cell size or immunohistochemically, for example, by using magnetic beads, affinity chromatography, fluorescence-activated cell sorting (FACS), flow cytometry, or with a suitable device.

Additionally, the isolated ASCs express antigens, including, but not limited to, CD73, CD90, CD29, CD44, CD105, and/or a combination thereof. Additionally or alternatively, the isolated ASCs do not express antigens, including, but not limited to CD33, CD34, CD45, CD4, CD31, CD62p CD14, HLA-DR, and/or combination thereof.

Additionally, a sample is set aside in order to evaluate the biological activity of the tissue using commercially available methods, including, but not limited to, for example, metabolic assays, such as involving luciferase, tetrazolium salts, e.g., 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS), 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT), and other water soluble tetrazolium salts (e.g., WST-1, -3, -4, -5, -8, -9, -10, and -11), and dye exclusion assays such as Tryptan Blue.

Alternatively, isolated ASCs can be cultured without differentiation using standard culture media typically supplemented with 5%-20% serum. For example, the ASCs are passaged at least 5 times in such medium without differentiating, while still retaining their multiplicity. Adipose-derived stem cells can be maintained in control medium until 80% confluent. Cells are harvested at confluence and population doubling calculated using the formula log N_1/log N_2, where N_1 is the number of cells at confluence prior to passaging and N_2 is the number of cells seeded after passaging. Cumulative population doubling is determined in cultures maintained until passage 13 (approximately 165 days). The mean cumulative population doubling obtained from 3 donors is expressed as a function of passage number.

Confirmation of Multi-lineage Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells

Adipose-derived stem cells at passage 1 can be analyzed for their capacity to differentiate toward the adipogenic, osteogenic, chondrogenic, and myogenic lineages. To induce differentiation, the stem cells are cultured with specific induction media as detailed in Table 12.

Table 12. Lineage-specific differentiation induced by media supplementation

Medium	Media	Serum	Supplementation
Control	DMEM	10% FBS	none
Adipogenic (AM)	DMEM	10% FBS	0.5 mM isobutyl-methylxanthine (IBMX), 1 µM dexamethasone, 10 uM insulin, 200 µM indomethacin, 1% antibiotic/antimycotic
Osteogenic (OM)	DMEM	10% FBS	0.1 µM dexamethasone, 50 µM ascorbate-2-phosphate, 10 mM β-glycerophosphate, 1% antibiotic/antimycotic
Chondrogenic (CM)	DMEM	1% FBS	6.25 µg/ml insulin, 10 ng/ml TGFβ1, 50 nM ascorbate-2-phosphate, 1% antibiotic/antimycotic
Myogenic (MM)	DMEM	10% FBS, 5% HS	0.1 µM dexamethasone, 50 µM hydrocortisone, 1% antibiotic/antimycotic

Each media has been previously described and shown to induce multi-lineage differentiation of MSCs (Pittenger, M. et al, 1999, Science 284: 143-147; Grigoradis, A. et al., 1988, J. Cell. Biol., 106: 2139-2151; Cheng, S-L. et al., 1994, Endo, 134: 277-286; Loffler, G. et al., 1987, Klin. Wochenschr., 65: 812-817; Hauner, H. et al., 1987, J. Clin. Endocrinol. Metabol. 64: 832-835). Differentiation is confirmed using the

histological and immunohistological assays outlined in Table 13 and compared to a commercial source of bone marrow-derived MSCs, lineage-specific precursors (positive controls), and human foreskin fibroblasts (HFFs) (negative controls)). The adipose-derived stem cells are maintained in Control Medium.

Table 13. Differentiation Markers And Assays Of Lineage-Specific Differentiation.

Lineage	Lineage-specific Determinant	Histologic/Immunohistochemical Assay
Adipogenic	1. Lipid Accumulation	1. Oil Red O stain
Osteogenic	1. Alkaline phosphatase activity	1. Alkaline phosphatase stain
	2. Calcified matrix production	2. Von Kossa stain
Chondrogenic	1. Sulfated proteoglycan-rich matrix	1. Alcian Blue (pH 1.0) stain
		2. Safranin O stain
	2. Collagen II synthesis	3. Collagen II-specific monoclonal antibody
Myogenic	1. Multi-nucleation	1. Phase contrast microscopy
	2. Skeletal muscle myosin heavy chain and MyoD1 expression	2. Myosin and MyoD1 specific monoclonal antibodies

Adipogenesis

Adipogenic differentiation can be induced by culturing the stem cells for 2 weeks in Adipogenic Medium (AM) and assessed using an Oil Red O stain as an indicator of intracellular lipid accumulation (Preece, A. 1972 A Manual for Histologic Technicians, Boston, Mass.: Little, Brown, and Co.). Prior to staining, the cells are fixed for 60 minutes at room temperature in 4% formaldehyde/1% calcium and washed with 70% ethanol. The cells are incubated in 2% (w/v) Oil Red O reagent for 5 minutes at room temperature. Excess stain is removed by washing with 70% ethanol, followed by several changes of distilled water. The cells are counter-stained for 2 minutes with hematoxylin.

Preparation of Decellularized Adipose Matrix

Decellularized adipose matrix is obtained either using the original rinseate or the thawed and filtered aspirate obtained during the ASC isolation procedure. Following a series of thorough washes with cold PBS, the washed tissue is soaked in lysis buffer with continuous mechanical agitation. The soaked tissue then is subjected to cell lysis to yield a decellularized tissue. The sterile decellularized tissue can be subjected to alternate procedures. For example, (1) it can be lyophilized and milled using a freezer mill to yield a decellularized adipose-derived matrix powder; (2) it can be homogenized to obtain a decellularized adipose-derived matrix paste or slurry; (3) it can be homogenized and lyophilized to obtain a three-dimensional adipose-derived matrix; or (4) it can be lyophilized to obtain an adipose decellularized tissue matrix sheet. It can be delipidized and decellularized according to any of the methods in Examples 1 through 5.

Recellularization

Adipose-derived decellularized matrices in powder, paste/slurry, three-dimensional or sheet form may be used to reseed isolated ASCs. Following the filtration step for isolating ASCs, the isolated stromal-vascular fraction (SVF) enriched with ASCs or otherwise purified ASCs are resuspended in basal or nutrient enriched medium. A portion of the resuspended SVF fraction or otherwise purified ASCs are then added to a sample of an adipose-derived decellularized matrix produced in any form (powder, paste/slurry, three dimensional or sheet). The decellularized adipose matrix containing the ASCs is incubated at 37°C. The incubation step is followed by static or dynamic seeding conditions for 24 hours, which are well known in the art. The re-cellularized adipose matrix is then subjected to a series of cold PBS rinses to wash away unwanted non-adherent cells.

Cryopreservation and Thawing

Additionally, prior to cryopreservation, one or more growth-inductive components optionally can be added. These include, but are not limited to, bone morphogenic proteins (BMPs), vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), transforming growth factor beta (TGFβ), platelet-derived growth factor

(PDGF), neural epidermal growth-factor-like 1 (NELL-1), and a combination thereof. For cryopreservation, for example, mesencult basal media is prepared and sterile filtered. A cryoprotectant solution in basal or nutrient rich medium is added in order to assure full coverage of the tissue. Exemplary cryoprotectant include, but are not limited to, dimethyl sulfoxide (DMSO), glycerol, ethylene glycol, propylene glycol, 2-Methyl-2.4-pentanediol (MPD), and sucrose. The samples are packaged in cryoresistant containers. One sample as a probe sample is cryopreserved in a laboratory cryopreservation unit. The packaged tissue is then subjected to slow controlled rate freezing to at least -80 °C. Once the program cycle is complete, the tissue is placed in liquid nitrogen.

Prior to implantation, a cryopreserved adipose implant is thawed. The thaw procedure warms the tissue preparing it for implantation. The vial containing cryopreservation solution and tissue is thawed at room temperature or alternatively warmed to 37 °C to expedite the thawing process. Alternatively, the thawing temperature can be at a temperature in the range of about 4 °C through 50 °C. Alternatively, the freeze-thawing process can be repeated. Once the cryopreservation solution is free flowing, the cryopreservation solution is decanted from the vial and the tissue is implanted immediately, without any rinse. Prior to implantation, the tissue is optionally rinsed for 0-15 minutes with the other wash solutions including but not limited to saline, 5% dextrose in lactated ringers solution, phosphate buffered saline, and any additional isotonic solution.

The wash solution is added at room temperature or alternatively, prior to application to the tissue, the wash solution is warmed to a temperature not exceeding 37°C-39°C in order to minimize any damage to the cells contained in the tissue. The wash solution is exchanged throughout the rinse or alternatively the tissue is stored in the wash solution at 4°C until ready for implantation. Any remaining tissue from the surgery is not re-frozen for future use. All remaining tissue is disposed of appropriately after surgery.

A strainer is used to contain the tissue during the decanting process. This allows the cryopreservation solution and rinseate to be removed from the tissue while minimizing any possible contamination of tissue during preparation (minimizes human contact). Gauze is optionally used to contain the tissue during the decant/thaw procedure.

As described in detail above, adipose-derived stem cells possess a potential to differentiate into a wide variety of cell types, including, but not limited to, nerve cells, astrocytes, fat cells, chondrogenic cells, osteogenic cells, or insulin-releasing pancreatic cells.

II. Source Tissue: Dermis

Acellular matrices derived from the dermis may have forms such as sheets, meshes, particles, and other forms. As sheets or meshes, they may be used to repair or provide support for other membranous tissues. Some specific applications for sheets or meshes include use as slings for breast reconstruction, application to wounds or burns where skin has been destroyed or excised, application as a patch to repair perforations, as a support for weakened tissues, or to cover gaps in native tissues. In particulate forms, it may be injected as a bulking agent (e.g., to restore natural contours to damaged or wasted tissues), or applied to wounds in a paste, slurry, or dry form to facilitate regeneration of damaged tissue. The acellular matrices may also be used to deliver precursor cells and/or tissuegenic factors for repair or regeneration of dermis or other tissue types. The foregoing summary of uses is intended to be representative, and not to limit the range of uses for acellular dermis-derived matrices according to embodiments of the present invention.

Example 7: Decellularization of Tissue Using a Hypertonic Solution

A sample of skin tissue is isolated from a suitable donor and inspected for damage (e.g., holes or tears), and distinctive features (e.g., moles, warts, tattoos), which are removed with a scalpel. Tissue is inspected for hair, and same is removed using forceps. Where the processed tissue is to be used in the form of strips or sheets,

the tissue is inspected for a uniform thickness. Otherwise, the tissue may be reduced in size, (e.g., by grinding or mincing). The epidermis is removed before further processing of the dermis.

A sample of dermis is measured into a flask and a hypertonic solution (e.g., 1M NaCl) is added in a 2:1 ratio. The mixture is mechanically agitated for at least 12 hours at an ambient temperature. After agitation, the hypertonic solution is decanted, and the dermis is captured in a 212 µm to 300 µm sieve. The recovered dermis is returned to the flask, and soaked in an 0.1% surfactant solution with mechanical agitation for at least 12 hours at ambient temperature.

Following the last water rinse, the dermis is soaked in a sterilizing solution, with mechanical agitation. One suitable sterilizing solution would be 0.5% to 1.0% peracetic acid in a mixture of water, ethanol, and propylene glycol. One or more additional soaks in sterilizing solution may be needed to adequately sterilize the adipose tissue. After the final sterilizing soak, the dermis is rinsed repeatedly in deionized water to remove any traces of sterilizing solution from the tissue.

Following the final water rinse, the dermis is stored under refrigeration or frozen, or it is subjected to further processing steps, such as delipidization, which may be performed by the method of Example 3, the method of Example 4, the delipidization step of Example 5, or other methods disclosed herein.

Example 8: Particularization of a Decellularized Dermis

A sample of dermis is decellularized as in Example 7, above. The sample is then lyophilized according to a commercially-available process.

The lyophilized dermis is then milled to a particulate form. It may be further milled in a frozen state (e.g., impact milling, or freezer-milling) to further reduce the particle size of the tissue, and produce a flowable particulate tissue. Suitable milling protocols are known in the art.

The particulate tissue may be packaged in a sterile container for later use, or thawed and rehydrated immediately. In one rehydration method, a desired amount of the thawed particulate tissue is added to a first syringe. The desired amount of fluid (e.g., a carrier) is added to a second syringe, and the syringes are attached to each other using a female-to-female locking cap. The fluid is ejected slowly into the tissue-filled syringe, while depressing the plungers of both syringes. The entirety of the mixture of tissue and fluid is transferred to one of the syringes, and the other is discarded. The syringe containing the mixture is stoppered and packaged in foil and/or ora Kapak® pouch (Kapak Corporation, St. Louis Park, MN).

* * *

It will be understood that the embodiments described herein are merely exemplary and that a person of ordinary skill in the art may make many variations and modifications without departing from the spirit and scope of the invention. All such variations and modifications are intended to be included within the scope of the invention, as defined by the appended claims.

Claims

We claim:

1. A composition, comprising a delipidated, decellularized adipose tissue.

2. The composition of Claim 1, wherein said adipose tissue is substantially free of native lipids.

3. The composition of Claim 1, wherein said adipose tissue is substantially free of native cellular components.

4. The composition of Claim 1, wherein said adipose tissue is substantially free of native nucleic acids.

5. The composition of Claim 1, further comprising exogenous tissuegenic cells.

6. The composition of Claim 5, wherein said exogenous tissuegenic cells include exogenous stem cells.

7. The composition of Claim 5, wherein said exogenous tissuegenic cells include adipose-derived stem cells.

8. The composition of Claim 1, further comprising at least one exogenous growth-inductive substance.

9. The composition of Claim 8, wherein said at least one exogenous growth-inductive substance is selected from the group consisting of bone morphogenic proteins, vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, transforming growth factor beta, platelet-derived growth factor, and neural epidermal growth-factor-like 1.

10. The composition of Claim 1, wherein said delipidated, decellularized adipose tissue is substantially free of substances that pose a significant risk of causing an immunogenic response in a patient receiving said composition.

11. The composition of Claim 1, further comprising a carrier for said delipidated, decellularized adipose tissue.

12. The composition of Claim 11, wherein said carrier includes a substance selected from the group consisting of an isotonic solution, a sodium chloride solution, lactated Ringer's solution, a phosphate-buffered saline solution, platelet rich plasma, hyaluronic acid, a derivative of hyaluronic acid, sodium hyaluronate, thrombin, fibrin, glycerin, collagen, lecithin, sugars, polysaccharides, and solutions thereof.

13. The composition of Claim 11, wherein said carrier includes a substance selected from the group consisting of polysaccharides, nucleic acids, carbohydrates, proteins, polypeptides, poly(α-hydroxy acids), poly(lactones), poly(amino acids), poly(anhydrides), poly(orthoesters), poly(anhydride-co-imides), poly(orthocarbonates), poly(α-hydroxy alkanoates), poly(dioxanones), poly(phosphoesters), poly(L-lactide) (PLLA), poly(D,L-lactide) (PDLLA), polyglycolide (PGA), poly(lactide-co-glycolide (PLGA), poly(L-lactide-co-D, L-lactide), poly(D,L-lactide-co-trimethylene carbonate), polyhydroxybutyrate (PHB), poly(ε-caprolactone), poly(δ-valerolactone), poly(γ-butyrolactone), poly(caprolactone), polyacrylic acid, polycarboxylic acid, poly(allylamine hydrochloride), poly(diallyldimethylammonium chloride), poly(ethyleneimine), polypropylene fumarate, polyvinyl alcohol, polyvinylpyrrolidone, polyethylene, polymethylmethacrylate, carbon fibers, poly(ethylene glycol), poly(ethylene oxide), poly(vinyl alcohol), poly(vinylpyrrolidone), poly(ethyloxazoline), poly(ethylene oxide)-co-poly(propylene oxide) block copolymers, poly(ethylene terephthalate)polyamide, and copolymers thereof

14. A delipidated, decellularized adipose tissue.

15. A method of preparing an adipose tissue-derived matrix, comprising the step of decellularizing a delipidated adipose tissue.

16. A method of preparing an adipose tissue-derived matrix, comprising the separate steps of delipidating the adipose tissue and decellularizing the delipidated adipose tissue.

17. A method of preparing an adipose tissue-derived matrix, comprising the steps of:

obtaining an adipose tissue;

reducing the size of the adipose tissue;

delipidating the mechanically reduced adipose tissue with a polar organic solvent;

decellularizing the delipidated adipose tissue with a detergent solution; and

disinfecting the delipidated, decellularized adipose tissue.

18. The method of Claim 17, including the further steps of drying the disinfected adipose tissue; and reducing the dried adipose tissue to a dried particulate form.

19. The method of Claim 17, wherein said step of reducing the size of the adipose tissue includes a step of grinding the adipose tissue.

20. The method of Claim 19, wherein said step of grinding the adipose tissue includes a step of grinding the adipose tissue with a coarse grinding plate, followed by a step of grinding the ground adipose tissue with a fine grinding plate.

21. The method of Claim 19, including the further step of mechanically separating a lipid layer from the ground adipose tissue after said grinding step.

22. The method of Claim 17, wherein said polar organic solvent is selected from a group of polar solvents consisting of a polar solvent having one carbon atom, a polar solvent having two carbon atoms, a polar solvent having three carbon atoms, a polar solvent having four carbon atoms, a polar solvent having five carbon atoms, and a polar solvent having six carbon atoms.

23. The method of Claim 17, wherein said polar organic solvent includes an alcohol.

24. The method of Claim 17, wherein said polar organic solvent is selected from the group consisting of a paraffin, an aromatic hydrocarbon, a cyclic hydrocarbon, a chlorinated hydrocarbon, a fluorinated hydrocarbon, a chlorinated methane, a fluorinated methane, an alcohol, an ether, a ketone, an aldehyde, an ester, an organic acid, and combinations thereof.

25. The method of Claim 17, wherein said delipidating step includes the step of washing the mechanically reduced adipose tissue with the polar organic solvent.

26. The method of Claim 17, wherein said delipidating step includes the step of blending the mechanically reduced adipose tissue with the polar organic solvent.

27. The method of Claim 17, wherein said delipidating step includes the step of homogenizing the mechanically reduced adipose tissue with the polar organic solvent.

28. The method of Claim 17, wherein said decellularizing step includes a step of washing the delipidated adipose tissue with a detergent solution.

29. The method of Claim 25, wherein the detergent solution includes at least one of deoxycholic acid or a deoxycholate salt.

30. The method of Claim 25, wherein the detergent solution has a detergent concentration in the range of 0.1% to 5.0%.

31. The method of Claim 25, wherein the detergent solution includes a mixture of water and alcohol.

32. The method of Claim 31 wherein the alcohol is present in the detergent solution in an amount in the range of about 20% to about 40% by volume.

33. The method of Claim 31 wherein the alcohol is present in the detergent solution in an amount in the range of about 60% to about 80% by volume.

34. The method of Claim 17, further including the step of contacting the delipidated, decellularized adipose tissue with a solution having an acidic pH so as to form a gel.

35. The method of Claim 34, wherein said contacting step includes the step of blending the delipidated, decellularized adipose tissue with the acidic solution.

36. The method of Claim 17, further including the step of blending the disinfected adipose tissue in a polar liquid, whereby the disinfected adipose liquid and the polar liquid form a flowable gel.

37. The method of Claim 17, wherein said disinfecting step includes the step of contacting the delipidated, decellularized adipose tissue with a disinfectant solution.

38. The method of Claim 32, wherein said contacting step includes the step of soaking the delipidated, decellularized adipose tissue in the disinfectant solution.

39. The method of Claim 17, wherein said disinfecting step includes the step of blending the delipidated, decellularized adipose tissue with the disinfectant solution.

40. The method of Claim 39, wherein the disinfecting solution is an acidic solution.

41. The method of Claim 40, wherein the disinfecting solution includes peracetic acid.

42. The method of Claim 37, wherein the disinfecting solution includes an alcohol.

43. The method of Claim 42, wherein the disinfecting solution further includes a glycol.

44. The method of Claim 37, wherein said disinfecting step includes the step of washing the disinfected adipose tissue with a buffer having a physiologic pH after said contacting step.

45. The method of Claim 17, wherein said drying step includes the step of drying the disinfected adipose tissue in air.

46. The method of Claim 17, wherein said drying step includes the step of drying the disinfected adipose tissue with heat.

47. The method of Claim 17, wherein said drying step includes the step of lyophilizing the disinfected adipose tissue.

48. The method of Claim 17, wherein the step of reducing the size of the dried adipose tissue includes the step of milling the dried adipose tissue, thereby producing a dried particulate material.

49. The method of Claim 17, including the further step of packaging the dried particulate material in a dried particulate form.

50. The method of Claim 17, wherein the step of reducing the size of the dried adipose tissue includes the step of freezer-milling the dried adipose tissue, thereby producing a frozen dried particulate material.

51. The method of Claim 50, including the further step of thawing the frozen dried particulate material.

52. The method of Claim 51, including the further step of packaging the thawed dried particulate material in a dried particulate form.

53. The method of Claim 18, including the further steps of rehydrating the dried particulate material and mixing the rehydrated particulate material with a carrier.

54. The method of Claim 18, including the further steps of rehydrating the dried particulate material and seeding the rehydrated particulate material with exogenous tissuegenic cells to form a seeded scaffold material.

55. The method of Claim 54, including the further step of packaging the seeded scaffold material in a cryopreservative.

56. A method of preparing an adipose tissue-derived matrix, comprising the step of processing an adipose tissue to remove substantially all lipid and cellular material from the adipose tissue, said processing step including the step of contacting the adipose tissue with a polar organic solvent, and the step of contacting the adipose tissue with a detergent solution after said step of contacting the adipose tissue with a polar organic solvent.

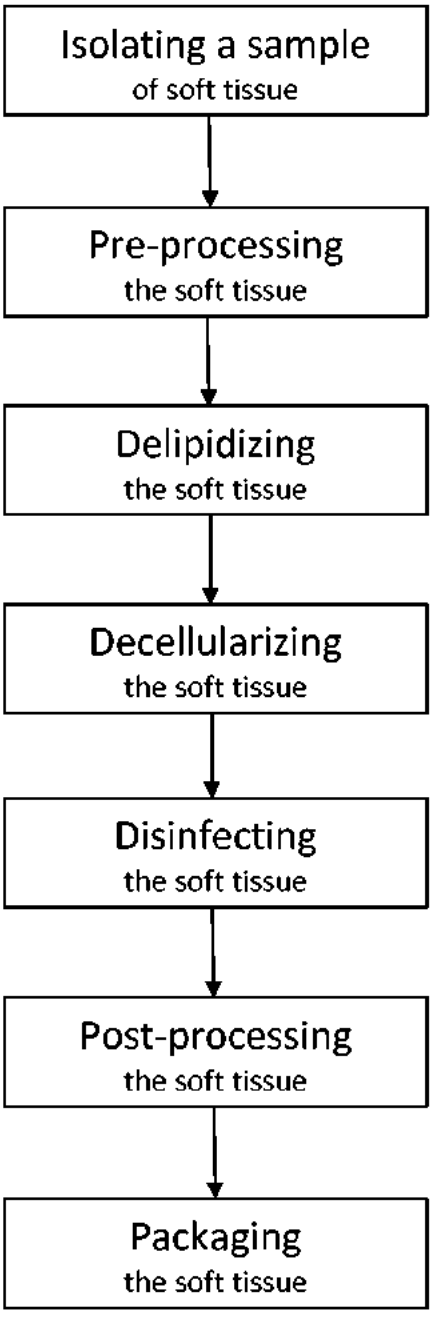

Isolating a sample
of soft tissue
Pre-processing
the soft tissue
Delipidizing
the soft tissue
Decellularizing
the soft tissue
Disinfecting
the soft tissue
Post-processing
the soft tissue
Packaging
the soft tissue

FIG. 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2014/048797

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61L27/36
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/166784 A1 (LIFECELL CORP [US]; CONNOR JEROME [US]) 6 December 2012 (2012-12-06) page 5, paragraph 23 page 6, paragraph 25 - page 8, paragraph 30 page 16, paragraph 47 claims ----- -/--	1-7,10, 11,14-16

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30 September 2014	09/10/2014

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Van den Bulcke, H

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/019822 A2 (UNIV JOHNS HOPKINS [US]; NAHAS ZAYNA [US]; ELISSEEFF JENNIFER H [US];) 17 February 2011 (2011-02-17) page 12, lines 6-9 page 16, lines 10-20 page 25, line 18 - page 26, line 27 example 2 claims	1-19, 22-30, 37-41, 44, 47-49, 53,54,56

X	WO 2011/087743 A2 (UNIV PITTSBURGH [US]; BADYLAK STEPHEN F [US]; FREUND JOHN M [US]; RUBI) 21 July 2011 (2011-07-21) page 4, lines 12-17 page 8, line 3 - page 9, line 8 page 12, line 11 - page 13, line 13 table 1 claims	1-55

X	WO 2012/002986 A2 (UNIV CALIFORNIA [US]; CHRISTMAN KAREN L [US]; YOUNG D ADAM [US]) 5 January 2012 (2012-01-05) page 12, paragraph 40 - page 17, paragraph 52 claims	1-16

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2014/048797

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012166784 A1	06-12-2012	AU 2012262311 A1	28-11-2013
		CA 2837196 A1	06-12-2012
		EP 2714111 A1	09-04-2014
		US 2012310367 A1	06-12-2012
		WO 2012166784 A1	06-12-2012
WO 2011019822 A2	17-02-2011	AU 2010282571 A1	01-03-2012
		CA 2770490 A1	17-02-2011
		CN 102575229 A	11-07-2012
		EP 2464724 A2	20-06-2012
		JP 2013501586 A	17-01-2013
		US 2012189588 A1	26-07-2012
		WO 2011019822 A2	17-02-2011
WO 2011087743 A2	21-07-2011	US 2013202563 A1	08-08-2013
		WO 2011087743 A2	21-07-2011
WO 2012002986 A2	05-01-2012	US 2012264190 A1	18-10-2012
		WO 2012002986 A2	05-01-2012

Clarke, Modet & Cº

COLOMBIA

Carrera 11 Nº 86-53 Piso 6 Bogotá Colombia Tel: (57 1) 6181088 ·Fax: (57 1) 6350824·Email: info@clarkemodet.com.co

PODER

Yo (nosotros), abajo firmante(s)

en mi (nuestro) carácter de representante(s) legales de

MUSCULOSKELETAL TRANSPLANT FOUNDATION

una sociedad organizada y existente de acuerdo con las leyes de **USA**

y en actual cumplimiento de su objeto social, con domicilio en

125 May Street, Suite 300, Edison Corporate Center Edison, NJ 08837, USA.

por el presente instrumento confiero poder especial a favor de **CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO**, con Cédula de Ciudadanía No. 66.783.790 de Palmira Valle, y tp. 141563 con domicilio en Bogotá, Colombia, para que actuando en nombre del (de la) otorgante le (la) representen ante cualquier entidad, autoridad y/o persona, especialmente ante las del orden Administrativo, Contencioso Administrativo, Judicial, Tribunales de Arbitramento y/o cualquier otro en lo referente a los siguientes asuntos:

1) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar cualquiera de las modalidades de Propiedad Industrial, tales como: patentes de invención, modelos de utilidad; diseños industriales, variedades vegetales; marcas, lemas, nombres y enseñas comerciales y denominaciones de origen; así como sus renovaciones, prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
2) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar derechos de autor, en cualquiera de sus presentaciones así como la protección de secretos industriales y know-how.
3) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar registros sanitarios, permisos y/o licencias de funcionamiento; así como sus renovaciones o prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
4) Ejercer acciones de oposición, observación, reclamos, reconsideración, reposición, apelación, cancelación administrativa o judicial, nulidad, protección al consumidor, concesión de licencias, protección de secretos industriales y demás acciones y recursos relacionados con derechos derivados de los asuntos arriba indicados y en contra de la competencia desleal, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias, acciones de indemnización de perjuicios. También podrá(n) intervenir en juicios civiles, comerciales, penales, contencioso-administrativos, tutelas y de policía; en acciones o juicios promovidos por el (la) mandante o en contra el (ella).
5) Registrar nombres de dominio ante la entidad competente.
6) En el ejercicio de este mandato los mandatarios arriba mencionados quedan facultados para: conciliar, cancelar, transigir, comprometer en árbitros, desistir, recibir y tomar posesión de la cosa objeto de litigio y renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión, admitir los hechos del proceso.
7) Ratificar o no la agencia oficiosa.
8) Así mismo faculto a los mencionados apoderados para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales, sustituir el presente poder y revocar las sustituciones que hicieren.

Dado y firmado en

a los días de

POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned

Jeffrey S. Cartmell

legal representative(s) of

MUSCULOSKELETAL TRANSPLANT FOUNDATION

an organization existing under the laws of **USA**

and in present execution of its business activity, domiciled at

125 May Street, Suite 300, Edison Corporate Center Edison, NJ 08837, USA

do hereby grant POWER OF ATTORNEY to **CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO**, identification card No. 66.783.790 of Palmira Valle, and tp. 141563 residing in Bogotá Colombia, to act in behalf of grantor before any entity, authority and/or natural or juridical person, specially before those Administrative, Administrative-Contentious, Judicial, arbitration courts, and/or any other, in all matters concerning the following:

1) To apply, process, obtain and/or register any of the modalities of Industrial Property, such as: Patents of Invention, Utility Models; Designs, plant varieties; Marks, Slogans, Trade Names and emblems and appellations of Origin; as well as their renewals, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
2) To apply, process, obtain and/or register copyrights of any kind as well as protection of industrial secrets or know-how.
3) To apply, process, obtain and/or register sanitary registrations, operating authorizations and/or licenses; as well as their renewals or assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
4) To bring actions of opposition, observations, claims, reconsideration, appeal or legal remedies, cancellations, nullity, protection to the consumer, granting of licenses, protection of trade secrets and other actions related with rights derived from the above- mentioned matters and against the unfair competition, actions resulting from the obtaining or exploitation of licenses, recovering damages actions. They can also intervene or participate in Civil, Commercial, Criminal or Contentious-Administrative Trials; the actions for writ mandamus, police actions; in actions, lawsuits or litigations instituted by the grantor or against him.
5) To register domain names before the competent entity.
6) To the effect of this mandate the above-named proxy are empowered to: conciliate, cancel, settle, submit to arbitration, withdraw and to receive and take possession of the litigation related objet and waive or renounce the rights granted or in process of granting, admit the facts of the case.
7) To ratify or not the officious agency.
8) I hereby appoint the afore mentioned attorneys with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys, substitute this Power of Attorney and to revoke such sustitutions.

Granted and signed at Edison, NJ USA

on this 21 day of January of 2016

Firma / signatura

NJ 229505969v1

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Una matriz derivada de tejido suave acelular incluye un tejido colagenoso que ha sido deslipidado y descelularizado. El tejido adiposo está entre los tejidos suaves que son adecuados para manufacturar una matriz derivada de tejido suave acelular. Las células tejidogénicas exógenas y otros factores biológicamente activos se pueden agregar a la matriz acelular. La matriz acelular se puede proporcionar como partículas, una suspensión espesa, una pasta, un gel o en alguna otra forma. La matriz acelular se puede proporcionar como un andamio tridimensional que ha sido reconstituido a partir de partículas del tejido tridimensional. El andamio tridimensional puede tener la configuración de una cualidad anatómica y puede servir como una plantilla para la reparación o el reemplazo de tejido. Un método para hacer una matriz derivada de tejido suave acelular incluye los pasos que consisten en retirar lípido del tejido suave por medio de la extracción con solvente y la descelularización química del tejido suave.