

ANDAMIOS PORCINOS Y MÉTODOS DE PREPARACIÓN

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reclama prioridad con respecto al número de serie 62/979,731 de los Estados Unidos, presentado el 21 de febrero de 2020.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Las matrices extracelulares (ECMs - *extracellular matrices*) son las moléculas segregadas que crean el microentorno para las células e imparten al tejido forma y resistencia (Brew, Dinakarbandian, & Nagase, 2000; Young, Holle, & Spatz, 2016). Los andamios biológicos creados de matriz extracelular (ECM) se están volviendo cada vez más comunes para el tratamiento de una variedad de afecciones médicas (Hussey, Dziki, & Badylak, 2018). Los andamios comercialmente disponibles se crean de una amplia variedad de fuentes; múltiples especies y tipos de tejidos se han procesado exitosamente en andamios biológicos, incluyendo la submucosa del intestino delgado porcino, el pericardio bovino, la vejiga urinaria porcina y la dermis humana (Agmon & Christman, 2016).

En la mayoría de ECMs comercialmente disponibles, el componente estructural es principalmente colágeno, con la mayoría comprendiendo colágeno tipo I (Badylak, Freytes, & Gilbert, 2009). Especies adicionales de colágeno de fibrillas, tipos III, V y XI, y formas de colágeno distinto de fibrillas, tipos IV y VIII, estarán presentes dependiendo del material fuente y el tipo de tejido (Theocharis, Skandalis, Gialeli, & Karamanos, 2016). Además del contenido de colágeno, las ECMs pueden contener varias moléculas de adhesión (Badylak et al., 2009) tales como elastina, fibronectina y laminina, las cuales dan a cada tipo de tejido una ECM única relacionada con la función tisular. El tercer componente estructural principal de la ECM (Badylak et al., 2009) son proteoglicanos (PG), una proteína base unida con uno o más glicosaminoglicanos (GAG). Algunos proteoglicanos extracelulares comunes son agregano, versicano y decorina pero, al igual que otras moléculas estructurales, el contenido de proteoglicanos varía con base en el material fuente y el tipo de tejido (Theocharis et al., 2016).

Cuando se crea un andamio biológico para curar tejido dañado, muchos factores influyen en la efectividad del andamio final; el material fuente, el tipo de tejido, la calidad de la fuente del tejido, el sitio del tejido, la edad del donante, el proceso de recuperación, la descélularización, el proceso de fabricación y la esterilización.

La membrana placentaria, con su papel crítico de protección y nutrición durante el desarrollo fetal, aporta propiedades únicas que la convierten en un tejido fuente ideal para un

andamio biológico (Shaifur Ra, Islam, Asaduzzama, & Shahedur R, 2015). A tal fin, la membrana placentaria humana (v.g., la membrana amniótica y/o el tejido coriónico) se han usado para varios tipos de procedimientos quirúrgicos reconstructivos desde principios de 1900. La membrana sirve como material substrato, designado más comúnmente como un apósito biológico o cubierta de una herida. Típicamente, las membranas placentarias humanas se recuperan después de una operación cesárea y se procesan mínimamente, de manera que el proceso de fabricación no altera las características relevantes originales de la membrana, relacionadas con la utilidad de la membrana para la reconstrucción, reparación, o reemplazo.

Una función principal de la membrana placentaria es constituir una barrera fisiológica para evitar la deshidratación (Mamede et al., 2012) y una barrera inmunológica para el feto. El tejido de la membrana placentaria exhibe propiedades antimicrobianas debido a la presencia de defensinas β -3 que actúan para impedir la colonización microbiana de la superficie epitelial (Chopra & Thomas, 2013; Niknejad et al., 2008). Propiedades antiinflamatorias, basadas en la presencia de interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10), TIMP-1, TIMP-2 y TIMP-4 (Hortensius & Harley, 2016; Mamede et al., 2012), de las membranas placentarias son igualmente benéficas para la cicatrización del tejido. Las membranas placentarias han mostrado evidencia clínica de epitelización (Dua, Gomes, King, & Maharajan, 2004; Subrahmanyam, 1995; Ward & Bennett, 1984) y el potencial de curar sin dejar cicatrices (Leavitt et al., 2016).

La calidad del material fuente para andamios biológicos podría constituir un desafío ya que todos los materiales naturales tienen alguna variabilidad inherente (Cardinal, 2015). Este reto prevalece especialmente en materiales fuente humanos. La variación en la expresión genética entre individuos se encuentra bien documentada (Genomes Project et al., 2010; International HapMap et al., 2010), y esa variación genética se ha demostrado en tejido de individuos únicos (O'Huallachain, Karczewski, Weissman, Urban, & Snyder, 2012). Aparte de la variabilidad genética, el tejido puede verse influenciado además por una multiplicidad de factores de riesgo ambientales y conductuales. Por ejemplo, el tejido amniótico humano recuperado puede verse afectado por el estilo de vida materno (Day et al., 2015). La expresión incrementada de enzimas citocromo P450, una familia de enzimas responsables de metabolizar compuestos tóxicos, es un marcador de estrés oxidativo en el tejido humano (Strolin-Benedetti, Brogin, Bani, Oesch, & Hengstler, 1999). Los tejidos placentarios humanos han demostrado tener concentraciones aumentadas de citocromo P450 en fumadores (Huuskonen et al., 2016), consumidores de drogas (Paakki et al., 2000), madres con un BMI (índice de masa corporal) >30 (DuBois et al., 2012), diabéticos (McRobie, Glover, & Tracy, 1998) y consumidores de alcohol (Collier, Tingle, Paxton, Mitchell, & Keelan, 2002). La edad maternal y gestacional han

demostrado alterar la expresión de citocromo P450 (Collier et al., 2002) y los factores de crecimiento (Lopez-Valladares et al., 2010) en tejidos placentarios humanos.

A pesar de la amplia variabilidad asociada con los productos placentarios humanos, en la última década, una toma de conciencia en aumento sobre las propiedades curativas asociadas con tales productos ha conducido a una demanda creciente, impulsando así el crecimiento del mercado. No obstante, existe en la técnica una necesidad de tratamientos para la cicatrización de heridas con una alta eficiencia clínica, que superen las inconsistencias de los productos de fuente humana, comercialmente disponibles.

RESUMEN DE LA DIVULGACIÓN

La presente divulgación se dirige generalmente a andamios porcinos y a procesos para producir tales andamios porcinos. Los andamios porcinos, tal como se divulgan aquí, exhiben varias propiedades regenerativas. Los andamios porcinos, tal como se proveen aquí, pueden cortarse en una variedad de tamaños, según sería deseable, para una aplicación particular. Los andamios porcinos pueden ponerse también en otras áreas del cuerpo que han sufrido una lesión, pero que no se han sometido a una intervención quirúrgica.

Se provee un andamio porcino. De acuerdo con una modalidad, el andamio porcino comprende una matriz extracelular placentaria porcina descelularizada que contiene por lo menos alrededor de 0,5% p/p de ácido hialurónico basado en el peso total del andamio porcino. De acuerdo con una modalidad, la matriz extracelular placentaria está sustancialmente desprovista de células intactas. De acuerdo con una modalidad, la matriz extracelular placentaria contiene hasta alrededor de 1200 ng de ADN bicatenario (*dsDNA*) por mg de andamio porcino. De acuerdo con una modalidad, el andamio porcino se formula como un constructo a base de membrana. De acuerdo con una modalidad, la matriz extracelular placentaria contiene por lo menos una membrana placentaria, por lo menos una membrana amniótica, por lo menos una membrana coriónica, o una combinación de las anteriores. De acuerdo con una modalidad, el andamio porcino comprende por lo menos alrededor de 1,0% p/p de ácido hialurónico basado en el peso total del andamio porcino. De acuerdo con una modalidad, el andamio porcino contiene por lo menos alrededor de 1,5% p/p de ácido hialurónico basado en el peso total del andamio porcino. De acuerdo con una modalidad, el andamio porcino contiene por lo menos alrededor de 2,0% p/p de ácido hialurónico basado en el peso total del andamio porcino. De acuerdo con una modalidad, el andamio porcino contiene por lo menos alrededor de 2,5% p/p de ácido hialurónico basado en el peso total del andamio porcino. De acuerdo con una modalidad, el andamio porcino conserva por lo menos alrededor

de 50% p/p de cualquier ácido hialurónico presente en la membrana placentaria porcina nativa. De acuerdo con una modalidad, el andamio porcino conserva por lo menos alrededor de 45% de cualesquiera glicosaminoglicanos presentes en la membrana placentaria porcina nativa. De acuerdo con una modalidad, el andamio porcino conserva por lo menos alrededor de 66% de cualquiera elastina presente en la membrana placentaria porcina nativa. De acuerdo con una modalidad, el andamio porcino contiene hasta alrededor de 1650 ng de fibronectina por gramo de andamio porcino.

De acuerdo con un aspecto, se provee un andamio porcino que incluye una matriz extracelular placentaria porcina descelularizada tratada con un detergente y una solución alcalina.

De acuerdo con un aspecto, se provee un andamio porcino que incluye una matriz extracelular placentaria porcina descelularizada que contiene hasta alrededor de 85% p/p de colágeno total basado en el peso total del andamio porcino.

De acuerdo con un aspecto, se provee un andamio porcino que incluye una matriz extracelular placentaria porcina descelularizada que contiene hasta alrededor de 10% p/p de elastina basado en el peso total del andamio porcino.

De acuerdo con un aspecto, se provee un andamio porcino que una incluye matriz extracelular placentaria porcina descelularizada que contiene hasta alrededor de 3% p/p de ácido hialurónico basado en el peso total del andamio porcino.

De acuerdo con un aspecto, se provee un andamio porcino que incluye una matriz extracelular placentaria porcina descelularizada que contiene hasta alrededor de 2% p/p de glicosaminoglicanos sulfatados basado en el peso total del andamio porcino.

De acuerdo con un aspecto, se provee un andamio porcino que incluye una matriz extracelular placentaria porcina descelularizada que contiene hasta alrededor de 99% p/p de colágeno total, elastina, ácido hialurónico y glicosaminoglicanos sulfatados basado en el peso total del andamio porcino.

De acuerdo con un aspecto, se provee un andamio porcino que incluye una matriz extracelular placentaria porcina descelularizada que contiene hasta alrededor de 1650 ng de fibronectina por gramo de andamio porcino.

De acuerdo con un aspecto, se provee un andamio porcino que incluye una superficie que define una o más estructuras porosas (*fenestrations*).

Se provee así mismo un apósito para heridas. El apósito para heridas incluye un andamio porcino, tal como se provee aquí. De acuerdo con una modalidad, el apósito para heridas puede incluir una superficie que define una o más estructuras porosas.

De acuerdo con un aspecto, se provee un método de preparar un andamio porcino que incluye el paso de procesar la membrana placentaria porcina para formar un andamio porcino. De acuerdo con una modalidad, los métodos provistos aquí tienen como resultado un andamio porcino que conserva por lo menos alrededor de 50% p/p de cualquier ácido hialurónico presente en la membrana placentaria porcina nativa. De acuerdo con una modalidad, los métodos provistos aquí tienen como resultado un andamio porcino que conserva por lo menos alrededor de 45% p/p de cualesquiera glicosaminoglicanos presentes en la membrana placentaria porcina nativa. De acuerdo con una modalidad, los métodos provistos aquí tienen como resultado un andamio porcino que conserva por lo menos alrededor de 66% p/p de cualquiera elastina presente en la membrana placentaria porcina nativa. De acuerdo con una modalidad, los métodos provistos aquí tienen como resultado un andamio porcino que conserva por lo menos alrededor de 50% de glicosaminoglicanos sulfatados y no sulfatados presentes en la membrana placentaria porcina nativa.

De acuerdo con una modalidad, el paso de descelularizar una matriz extracelular placentaria porcina incluye tratar la membrana placentaria porcina con una solución detergente, la solución detergente incluyendo por lo menos una enzima proteasa. De acuerdo con una modalidad, la solución detergente incluye además por lo menos un detergente aniónico. De acuerdo con una modalidad, el paso de descelularizar la membrana placentaria porcina incluye tratar la membrana placentaria porcina con una solución de inactivación vírica, la solución de inactivación vírica incluyendo por lo menos una solución alcalina. De acuerdo con una modalidad, la solución alcalina incluye hidróxido de sodio en una cantidad de alrededor de 1 mL a alrededor de 50 mL de alrededor de 0,1M a alrededor de 3,0M de hidróxido de sodio por gramo de membrana placentaria porcina.

De acuerdo con un aspecto, se provee un método de tratar un defecto. El método de tratar un defecto incluye el paso de administrar un andamio porcino, tal como se provee aquí, a un defecto. El defecto puede localizarse en un mamífero necesitado de tratamiento. De acuerdo con una modalidad, el defecto se selecciona de una herida de espesor parcial, herida de espesor total, úlcera por presión, úlcera venosa, úlcera diabética, úlcera vascular crónica, herida tunelizada o socavada, herida quirúrgica, dehiscencia de la herida, abrasión, laceración, quemadura de segundo grado, desgarramiento de la piel y herida drenante. De acuerdo con una modalidad, el defecto es una herida o úlcera.

De acuerdo con otro aspecto, se proporciona un método de tratar una herida, el cual incluye los pasos de proveer un constructo a base de polvo, tal como se provee aquí, y poner el

constructo a base de polvo sobre o alrededor de una herida. De acuerdo con una modalidad, la herida es una úlcera, abrasión o quemadura.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1 muestra una dehiscencia de herida quirúrgica postoperatoria en un paciente masculino de 63 años.

FIG. 2 muestra la herida quirúrgica postoperatoria de FIG. 1 después de dos semanas de tratamiento de cuidado estándar.

FIGS. 3-7 muestran la herida quirúrgica postoperatoria de FIG. 1 después de cinco tratamientos semanales sucesivos con una modalidad de un andamio porcino.

FIG. 8 muestra la herida quirúrgica postoperatoria de FIG. 1 después de la quinta aplicación del andamio porcino.

FIG. 9 muestra la herida quirúrgica postoperatoria de FIG. 8 un mes después de la quinta aplicación del andamio porcino.

FIG. 10 muestra una dehiscencia de una herida quirúrgica postoperatoria en un paciente femenino de 77 años.

FIG. 11 muestra la herida quirúrgica postoperatoria de FIG. 10 después de cuatro semanas de tratamiento de cuidado estándar.

FIG. 12 muestra la herida quirúrgica postoperatoria de FIG. 10 después de una semana de tratamiento con una modalidad de un andamio porcino.

FIG. 13 muestra la herida quirúrgica postoperatoria de FIG. 10 seis semanas después del tratamiento con una modalidad de un andamio porcino.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente divulgación se describirá ahora en forma más completa a continuación, con referencia a modalidades ejemplares de la misma. Estas modalidades ejemplares se describen de manera que esta divulgación será exhaustiva y completa, y transmitirá íntegramente el alcance de la divulgación a los expertos en la materia. Por supuesto, la presente divulgación puede incorporarse en muchas formas diferentes y no debe interpretarse como limitada a las modalidades expuestas aquí; más bien, estas modalidades se proveen de manera que esta divulgación satisfará los requisitos legales aplicables.

Tal como se emplea en el capítulo descriptivo, y en las reivindicaciones incluidas al final, las formas del singular “un/una”, “uno/una”, “el/la”, incluyen los referentes del plural, a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Tal como se emplea en el capítulo

descriptivo, y en las reivindicaciones incluidas al final, los términos "opcional" u "opcionalmente" significan que el evento o circunstancia descrito posteriormente puede ocurrir o no.

Tal como se emplea aquí, el término "tejido de nacimiento" incluye, pero sin limitarse a, elementos de tejido de nacimiento de mamífero tal como, por ejemplo, la membrana placentaria (la membrana amniótica y la membrana coriónica), gelatina de Wharton, el cordón umbilical, la arteria umbilical, la vena umbilical y el líquido amniótico.

Tal como se emplea aquí, el término "producto ECM comercializado" es un producto de la matriz extracelular comercializado, compuesto de un material fuente de la submucosa del intestino delgado porcino.

Tal como se emplea aquí, los términos "estructura porosa" ("*fenestration*") y "dotado de una estructura porosa" ("*fenestrated*") pueden usarse indistintamente y se refieren a constructos a base de membrana placentaria, los cuales se han modificado adicionalmente para incluir por lo menos uno o una pluralidad de orificios pasantes predeterminados (estructuras porosas) en el constructo. Tales orificios permiten que el exudado pase a través del constructo. Adicionalmente, el número y el tamaño de los orificios se predetermina para asegurar que las estructuras porosas estén apropiadamente distanciadas con el fin de dar una oportunidad suficiente para que el exudado producido por una herida pase a través del constructo, manteniendo al mismo tiempo un área superficial del constructo suficiente para tratar efectivamente la herida.

Tal como se emplea aquí, el término "membrana placentaria" se refiere a la membrana placentaria intacta, completa, incluyendo las capas amniótica y coriónica que se obtienen de un mamífero tal como, por ejemplo, un cerdo o un humano.

Tal como se emplea aquí, el término "membrana" se refiere a por lo menos una membrana placentaria, por lo menos una membrana amniótica, por lo menos una membrana coriónica o cualquier combinación de las anteriores. Las membranas, tal como se designan aquí, se pueden obtener de un mamífero tal como, por ejemplo, un cerdo o un humano.

Tal como se emplea aquí, los términos "cerdo" y "porcino" pueden usarse indistintamente.

Tal como se emplea aquí, los términos "andamio porcino" y "constructo a base de polvo" se refieren a un constructo que se aplica sobre o alrededor de un área lesionada de un cuerpo de mamífero.

Tal como se emplea aquí, los términos "defecto" y "herida" pueden usarse indistintamente y se refieren a un área necesitada de tratamiento, tal como un área lesionada del cuerpo de mamífero.

Tal como se emplea aquí, el término “descelularización” se refiere al proceso por el cual la totalidad o sustancialmente la totalidad de las células intactas y los núcleos se retiran de la membrana placentaria, dejando una matriz extracelular placentaria derivada de la membrana placentaria original.

Tal como se emplea aquí, el término “matriz extracelular placentaria” se refiere a la membrana placentaria descelularizada, por lo cual la totalidad o sustancialmente la totalidad de las células intactas y los núcleos se retiran de la membrana placentaria, dejando una red tridimensional que consta de macromoléculas extracelulares, tales como colágeno, elastina, glicosaminoglicanos, laminina y fibronectina, que proporcionan un soporte tanto estructural como bioquímico cuando se utiliza en el cuerpo del paciente.

Tal como se emplea aquí, el término “andamio” se refiere a una estructura de matriz extracelular descelularizada que les permite a las células del paciente infiltrarse y contribuir en la cascada de cicatrización y en la regeneración del tejido lesionado. Los andamios provistos aquí incluyen matrices extracelulares derivadas de tejido de nacimiento tal como la membrana placentaria porcina u otra membrana placentaria de mamífero.

Tal como se emplea aquí, el término “nativo” se refiere a la condición de un tejido después de obtenerlo de un mamífero, pero antes de ser sometido a los pasos de preparación provistos aquí.

La presente divulgación provee un andamio de matriz extracelular, el cual se prepara de tejido de nacimiento de mamífero. La presente divulgación proporciona particularmente un andamio porcino que se prepara de un tejido de nacimiento de cerdo. Sin embargo, los métodos y usos provistos aquí pueden aplicarse a cualquier tejido de nacimiento de fuente mamífera para formar un andamio apropiado para propósitos regenerativos. Mamíferos apropiados incluyen, pero sin limitarse a, humano, bovino, equino, caprino, u ovino.

La placenta porcina suministra un material fuente único para un andamio de matriz extracelular, superando los desafíos inherentes asociados con la placenta humana. Factores sociales que impactan seriamente la disponibilidad y la calidad del tejido de fuente humana (v.g., obesidad, tabaco, alcohol y consumo de drogas) están ausentes en la placenta porcina. Por el contrario, las cerdas criadas con esa finalidad tienen una vida enteramente reglamentada en la que la edad, la dieta, el régimen de ejercicio/nivel de actividad, y el cuidado de la salud de las cerdas están bajo completo control del criador, reduciendo en consecuencia la variabilidad del material inicial placentario porcino. Por ejemplo, a diferencia de los criterios de edad ampliamente adoptados para las membranas placentarias humanas, los cuales abarcan a todas las mujeres de años de maternidad independientemente de la edad, las cerdas se crían

desde la edad de un año hasta alrededor de la edad de seis años, lo cual corresponde a una edad humana en el intervalo de 16 a 35 años. Las cerdas paren los cerditos en alrededor de 114 días de gestación. La combinación de una edad maternal y gestacional baja disminuye el riesgo de que marcadores de estrés (v.g., enzimas citocromo P450) estén presentes en el tejido porcino.

Los andamios porcinos y los métodos provistos aquí buscan abordar la necesidad, no satisfecha en el mercado actual de membranas placentarias humanas, suministrando un material fuente alternativo que supere los retos inherentes asociados con la placenta humana anotados aquí. Aparte del hecho de que el material de fuente porcina no tiene los mismos problemas de edad, salud y estilo de vida que pueden impactar los productos humanos, los presentes andamios porcinos les permiten a las células hospederas infiltrar el andamio y el área afectada (v.g., defecto), depositar el colágeno y remodelar fácil y rápidamente el defecto.

Los andamios porcinos, como se proveen aquí, pueden contribuir en la cascada de cicatrización o en el proceso de cicatrización de un defecto de mamífero tal como una herida o una úlcera. Los andamios porcinos pueden reabsorberse completamente por el cuerpo del mamífero durante el proceso de cicatrización. Se proveen métodos para procesar asépticamente la membrana placentaria con el fin de preparar los andamios porcinos. De acuerdo con una modalidad, la matriz extracelular placentaria porcina se prepara de membranas placentarias que permanecen intactas porque las membranas placentarias conservan las capas de la membrana amniótica y coriónica y cualesquiera capas intermedias. De acuerdo con una modalidad, la membrana placentaria se procesa en una manera tal que se conserven todas las capas nativas, excepto por la gelatina de Wharton.

Los andamios porcinos, como se proveen aquí, pueden formularse como un constructo a base de membrana. De acuerdo con una modalidad, el andamio porcino incluye una o más capas de membrana placentaria porcina que contienen la membrana placentaria intacta, completa, o una o más capas del amnios o corión aislados. De acuerdo con una modalidad, la membrana placentaria porcina contiene una matriz extracelular placentaria porcina descelularizada, deshidratada, como se provee aquí. De acuerdo con otra modalidad, el andamio porcino, como se provee aquí, puede formularse igualmente como un polvo, gel, líquido o aspersión.

De acuerdo con una modalidad, cuando se formula como un andamio a base de membrana, la membrana placentaria seleccionada para procesarse con el fin de formar el andamio puede tratarse para posibilitar la administración de una variedad de antibióticos, agentes antiinflamatorios, factores de crecimiento y/u otras proteínas especializadas o

moléculas pequeñas. Adicionalmente, el andamio resultante a base de membrana puede combinarse con, o cubrirse por, un sustrato (gasa estéril, material polimérico estéril u otro tejido o biomaterial) para aumentar la resistencia del andamio porcino para suturas o para incrementar la longevidad de un implante.

Un andamio, como se describe aquí, puede producirse procesando tejido de nacimiento de mamífero de acuerdo con uno cualquiera o todos los pasos provistos aquí, como aplicados a tejido de nacimiento. De acuerdo con una modalidad particular, un andamio porcino, como el descrito aquí, puede producirse procesando tejido de nacimiento de cerdo de acuerdo con los pasos provistos aquí.

De acuerdo con un aspecto, se provee un andamio porcino. De acuerdo con una modalidad, el andamio porcino comprende una matriz extracelular placentaria porcina descelularizada, que contiene uno más de colágeno I, colágeno III, colágeno IV, elastina, laminina, fibronectina, ácido hialurónico y glicosaminoglicanos sulfatados. De acuerdo con una modalidad, cada uno de los uno o más de colágeno I, colágeno III, colágeno IV, elastina, laminina, fibronectina, ácido hialurónico y glicosaminoglicanos sulfatados está presente en una cantidad que es diferente de la membrana placentaria porcina nativa que no se procesa de acuerdo con uno o más de los pasos de procesamiento provistos aquí.

De acuerdo con una modalidad, el andamio porcino, como se provee aquí, comprende una matriz extracelular placentaria porcina descelularizada que contiene por lo menos alrededor de 0,5% p/p de ácido hialurónico basado en el peso total del andamio porcino. De acuerdo con una modalidad, el andamio porcino contiene por lo menos alrededor de 1,0% p/p de ácido hialurónico basado en el peso total del andamio porcino. De acuerdo con una modalidad, el andamio porcino contiene por lo menos alrededor de 1,5% p/p de ácido hialurónico basado en el peso total del andamio porcino. De acuerdo con una modalidad, el andamio porcino contiene por lo menos alrededor de 2,0% p/p de ácido hialurónico basado en el peso total del andamio porcino. De acuerdo con una modalidad, el andamio porcino contiene por lo menos alrededor de 2,5% p/p de ácido hialurónico basado en el peso total del andamio porcino. De acuerdo con una modalidad, el andamio porcino conserva por lo menos alrededor de 50% p/p de cualquier ácido hialurónico presente en la membrana porcina nativa.

De acuerdo con una modalidad, la matriz extracelular placentaria que forma el andamio porcino está sustancialmente desprovista de células intactas. De acuerdo con una modalidad, la matriz extracelular placentaria contiene hasta alrededor de 1200 ng de ADN bicatenario (*dsDNA*) por mg de andamio porcino.

De acuerdo con una modalidad, el andamio porcino se formula como un constructo a base de membrana o andamio. De acuerdo con una modalidad, la matriz extracelular placentaria contiene por lo menos una membrana placentaria deshidratada, por lo menos una membrana amniótica deshidratada, por lo menos una membrana coriónica deshidratada, o una combinación de las anteriores. De acuerdo con una modalidad, la matriz extracelular placentaria está químicamente deshidratada.

De acuerdo con una modalidad, el andamio porcino conserva por lo menos alrededor de 45% de cualesquiera glicosaminoglicanos presentes en la membrana placentaria porcina nativa. De acuerdo con una modalidad, el andamio porcino conserva por lo menos alrededor de 66% de cualquiera elastina presente en la membrana placentaria porcina nativa. De acuerdo con una modalidad, el andamio porcino contiene hasta alrededor de 1650 ng de fibronectina por gramo de andamio porcino.

De acuerdo con una modalidad, se provee un andamio porcino que contiene una matriz extracelular placentaria porcina descelularizada, tratada con un detergente y una solución alcalina. De acuerdo con una modalidad, se provee un andamio porcino que incluye una matriz extracelular placentaria porcina descelularizada que contiene hasta alrededor de 85% p/p de colágeno total basado en el peso total del andamio porcino. De acuerdo con una modalidad, se provee un andamio porcino que incluye una matriz extracelular placentaria porcina descelularizada que contiene hasta alrededor de 10% p/p de elastina basado en el peso total del andamio porcino. De acuerdo con una modalidad, se provee un andamio porcino que incluye una matriz extracelular placentaria porcina descelularizada que contiene hasta alrededor de 3% p/p de ácido hialurónico basado en el peso total del andamio porcino. De acuerdo con una modalidad, se provee un andamio porcino que incluye una matriz extracelular placentaria porcina descelularizada que contiene hasta alrededor de 2% p/p de glicosaminoglicanos sulfatados basado en el peso total del andamio porcino. De acuerdo con una modalidad, se provee un andamio porcino que incluye una matriz extracelular placentaria porcina descelularizada que contiene hasta alrededor de 99% p/p de colágeno total, elastina, ácido hialurónico y glicosaminoglicanos sulfatados basado en el peso total del andamio porcino. De acuerdo con una modalidad, se provee un andamio porcino que incluye una matriz extracelular placentaria porcina descelularizada que contiene hasta alrededor de 1650 ng de fibronectina por gramo de andamio porcino.

De acuerdo con una modalidad, se provee un andamio porcino que incluye una superficie que define una o más estructuras porosas.

Se provee así mismo un apósito para heridas. El apósito para heridas incluye un andamio porcino, como el provisto aquí. De acuerdo con una modalidad, el apósito para heridas puede incluir una superficie que define una o más estructuras porosas. De acuerdo con una modalidad, el apósito para heridas puede combinarse con, o cubrirse por, un sustrato o apósito secundario no adherente (gasa estéril, material polimérico estéril u otro tejido o biomaterial) para aumentar la resistencia del andamio porcino para suturas o para prolongar la longevidad de un implante.

Se provee un método de preparar un andamio porcino. De acuerdo con una modalidad, el método incluye el paso de procesar la membrana placentaria porcina para formar un andamio porcino, en donde el andamio placentario porcino conserva por lo menos alrededor de 50% p/p de cualquier ácido hialurónico presente en la membrana placentaria porcina nativa. De acuerdo con una modalidad, el método incluye el paso de procesar la membrana placentaria porcina para formar un andamio porcino, en donde el andamio porcino conserva por lo menos alrededor de 45% p/p de cualesquiera glicosaminoglicanos presentes en la membrana placentaria porcina nativa. De acuerdo con una modalidad, el método incluye el paso de procesar la membrana placentaria porcina para formar un andamio porcino, en donde el andamio placentario porcino conserva por lo menos alrededor de 66% p/p de cualquiera elastina presente en la membrana placentaria porcina nativa. De acuerdo con una modalidad, el método incluye el paso de procesar la membrana placentaria porcina para formar un andamio porcino, en donde el andamio porcino conserva por lo menos alrededor de 40% p/p de cualesquiera glicosaminoglicanos presentes en la membrana placentaria porcina nativa. De acuerdo con una modalidad, el paso de procesar la membrana placentaria porcina para formar un andamio porcino incluye tratar la membrana placentaria porcina con una solución detergente, la solución detergente incluyendo por lo menos una enzima proteasa. De acuerdo con una modalidad, la solución detergente incluye adicionalmente por lo menos un detergente aniónico. De acuerdo con una modalidad, el paso de procesar la membrana placentaria porcina para formar un andamio porcino incluye tratar la membrana placentaria porcina con una solución de inactivación vírica, la solución de inactivación vírica incluyendo por lo menos una solución alcalina. De acuerdo con una modalidad, la solución alcalina incluye hidróxido de sodio en una cantidad de alrededor de 1 mL a alrededor de 50 mL de alrededor de 0,1M a alrededor de 3,0M de hidróxido de sodio por gramo de membrana placentaria porcina. De acuerdo con una modalidad, el andamio porcino conserva por lo menos alrededor de 50% de los glicosaminoglicanos sulfatados y no sulfatados presentes en la membrana placentaria porcina nativa.

De acuerdo con una modalidad, se provee un método de preparar un andamio porcino. El método comprende el paso de recolectar el tejido de nacimiento, incluyendo el cordón umbilical, la membrana placentaria (la membrana amniótica y coriónica) y el líquido amniótico de un cerdo hembra. De acuerdo con una modalidad, el método comprende el paso de recolectar el tejido de nacimiento, incluyendo el cordón umbilical, la membrana placentaria (la membrana amniótica y coriónica) y el líquido amniótico de un cerdo hembra. De acuerdo con una modalidad, el cerdo hembra no está genéticamente modificado para suspender o reducir la expresión del gen de la alfa-1,3 galactosiltransferasa funcional. De acuerdo con una modalidad, la membrana placentaria incluye el cordón umbilical adherido. Donantes potenciales de tejido de nacimiento se detectan selectivamente (*are screened*) y se analizan para excluir cualesquiera donantes que puedan presentar un riesgo para la salud. De acuerdo con una modalidad, el tejido de nacimiento se recupera de un parto de término completo (*a full-term delivery*) de una o más prole tal como un bebé o un cerdito(s). De acuerdo con una modalidad, el método comprende opcionalmente el paso de enjuagar el tejido de nacimiento, incluyendo el cordón umbilical y la membrana placentaria (la membrana amniótica y coriónica) por métodos conocidos por los expertos en la materia. De acuerdo con una modalidad, el método comprende además el paso de poner el tejido de nacimiento, incluyendo el cordón umbilical y la membrana placentaria (la membrana amniótica y coriónica), en un recipiente de transporte. De acuerdo con una modalidad, el método comprende además el paso de poner el tejido de nacimiento, incluyendo el cordón umbilical y la membrana placentaria (la membrana amniótica y coriónica), en un recipiente de transporte que contiene la solución de transporte.

De acuerdo con una modalidad, el método comprende opcionalmente el paso de congelar el cordón umbilical y la membrana placentaria por métodos conocidos por los expertos en la materia. De acuerdo con una modalidad, el cordón umbilical y la membrana placentaria pueden conservarse congelados hasta cuando se requiera un procesamiento adicional. De acuerdo con una modalidad, el método comprende además el paso de retirar el cordón umbilical embolsado, congelado y la membrana placentaria del congelador y descongelarlos en un refrigerador. De acuerdo con una modalidad, el método comprende igualmente el paso de descongelar el cordón umbilical y la membrana placentaria a temperatura ambiente. De acuerdo con una modalidad, el método comprende opcionalmente el paso de poner cualquier líquido amniótico congelado, retenido, en un recipiente.

De acuerdo con una modalidad, el método comprende enjuagar el cordón umbilical y la membrana placentaria con agua. De acuerdo con una modalidad, el método comprende drenar

el cordón umbilical y la membrana placentaria. De acuerdo con una modalidad, el método comprende separar la membrana placentaria del cordón umbilical.

De acuerdo con una modalidad, el método comprende el paso de dividir la membrana placentaria en pedazos. De acuerdo con una modalidad, una cuchilla giratoria u otra cuchilla apropiada se usa para cortar los pedazos. Cuando se formula como un constructo a base de membrana, el tejido de nacimiento puede cortarse en varios tamaños, espesores y formas. Los pedazos de la membrana placentaria son preferiblemente de un tamaño y forma suficientes para aplicarse sobre, o alrededor de, una herida que se ubica sobre, o en, el cuerpo de un paciente mamífero. El espesor de la membrana placentaria puede variar dependiendo de la aplicación, el tipo de membrana y el número de capas de la membrana.

De acuerdo con una modalidad, el método comprende el paso de retirar la gelatina de Wharton y el exceso de líquidos de la membrana placentaria para producir una membrana placentaria limpia.

De acuerdo con una modalidad, el método comprende el paso de tratar la membrana placentaria con una solución de reducción de carga biológica. De acuerdo con una modalidad preferida, la solución de reducción de carga biológica es cloruro de sodio. De acuerdo con una modalidad, el método comprende el paso de añadir desde alrededor de 1 mL a alrededor de 100 mL de 0,1M a alrededor de 5M de solución de cloruro de sodio por gramo de membrana placentaria. De acuerdo con una modalidad, el método comprende el paso de sumergir la membrana placentaria en la solución de cloruro de sodio desde alrededor de quince minutos a alrededor de ocho horas. De acuerdo con una modalidad, el método comprende el paso de agitar la membrana placentaria en la solución de cloruro de sodio desde alrededor de quince minutos a alrededor de ocho horas a alrededor de 20 RPM a alrededor de 100 RPM.

De acuerdo con una modalidad, el método comprende el paso de decantar el cloruro de sodio. De acuerdo con una modalidad, el método comprende el paso de enjuagar la membrana placentaria con agua. De acuerdo con una modalidad, la membrana placentaria se enjuaga una vez con agua. De acuerdo con una modalidad, el paso de enjuagar se lleva a cabo múltiples veces con agua. De acuerdo con una modalidad, la membrana placentaria se enjuaga desde alrededor de dos veces a alrededor de cinco veces con agua.

De acuerdo con una modalidad, el método comprende el paso de poner la membrana placentaria en desde alrededor de 1 mL a alrededor de 100 mL de una solución detergente. De acuerdo con una modalidad, el detergente está presente en una concentración de alrededor de 0,1% a alrededor de 10% p/v. De acuerdo con una modalidad, la solución detergente comprende por lo menos un detergente iónico. De acuerdo con una modalidad particular, la

solución detergente incluye por lo menos un detergente aniónico. De acuerdo con una modalidad particular, la solución detergente incluye por lo menos un detergente aniónico y por lo menos una enzima proteasa. De acuerdo con una modalidad, la solución detergente contiene fosfatos, con un contenido de fósforo de alrededor de 7,5%. De acuerdo con una modalidad, la solución detergente incluye fosfatos, carbonatos, alquil aril sulfonato lineal de sodio y por lo menos una enzima proteasa. De acuerdo con una modalidad, el método comprende el paso de sumergir la membrana placentaria en la solución detergente durante desde alrededor de quince minutos a alrededor de ocho horas. De acuerdo con una modalidad, el método comprende el paso de agitar la membrana placentaria en la solución detergente durante desde alrededor de quince minutos a alrededor de ocho horas a alrededor de 20 RPM a alrededor de 100 RPM.

De acuerdo con una modalidad, el método comprende el paso de decantar la solución detergente. De acuerdo con una modalidad, el método comprende el paso de enjuagar la membrana placentaria con agua. De acuerdo con una modalidad, la membrana placentaria se enjuaga una vez con agua. De acuerdo con una modalidad, la membrana placentaria se enjuaga múltiples veces con agua. De acuerdo con una modalidad, la membrana placentaria se enjuaga desde alrededor de dos veces a alrededor de cinco veces con agua.

De acuerdo con una modalidad, el método comprende el paso de tratar la membrana placentaria con una solución de inactivación vírica, tal como, por ejemplo, hidróxido de sodio, peróxido de hidrógeno, etanol o dióxido carbónico supercrítico. De acuerdo con una modalidad preferida, la solución de inactivación vírica es hidróxido de sodio. De acuerdo con una modalidad, el método comprende el paso de añadir o introducir desde alrededor de 1 mL a alrededor de 50 mL de alrededor de 0,1M a alrededor de 3,0M de hidróxido de sodio por gramo de membrana placentaria. De acuerdo con una modalidad, el método comprende el paso de sumergir la membrana placentaria en el hidróxido de sodio durante alrededor de 1 minuto a alrededor de 120 minutos. De acuerdo con una modalidad, el método comprende el paso de agitar la membrana placentaria en el hidróxido de sodio durante alrededor de 1 minuto a alrededor de 120 minutos a alrededor de 20 RPM a alrededor de 100 RPM. El hidróxido de sodio puede entonces decantarse. De acuerdo con una modalidad, los pasos de añadir hidróxido de sodio, agitar y decantar pueden repetirse tantas veces como sea necesario para inactivar cualesquiera virus presentes en la membrana placentaria para producir una membrana placentaria que esté sustancialmente libre de virus. De acuerdo con una modalidad, los pasos de añadir hidróxido de sodio, agitar y decantar pueden repetirse una vez. De acuerdo con una modalidad, los pasos de añadir hidróxido de sodio, agitar y decantar pueden repetirse hasta cinco veces. De acuerdo con una modalidad preferida, el método comprende el paso de

añadir o introducir desde alrededor de 5 mL a alrededor de 15 mL de 0,25M de hidróxido de sodio por gramo de membrana placentaria. De acuerdo con una modalidad preferida, el método comprende el paso de añadir o introducir alrededor de 10 mL de 0,25M de hidróxido de sodio durante alrededor de 20 minutos, agitar, decantar y repetir el proceso una vez. De acuerdo con esta modalidad preferida, el andamio porcino resultante está sustancialmente desprovisto de virus, pero se preserva mucha de la composición de la matriz extracelular, incluyendo un porcentaje sustancial de los glicosaminoglicanos. De acuerdo con una modalidad, el método comprende el paso de enjuagar la membrana placentaria con agua.

De acuerdo con una modalidad, el método comprende el paso de añadir o introducir desde alrededor de 1 mL a alrededor de 50 mL de solución amortiguadora (*buffer solution*) por gramo de membrana placentaria. De acuerdo con una modalidad, el método comprende el paso de sumergir la membrana placentaria en la solución amortiguadora. De acuerdo con una modalidad, el método comprende el paso de agitar la membrana placentaria en la solución amortiguadora durante alrededor de 1 minuto a alrededor de 120 minutos a alrededor de 20 RPM a alrededor de 100 RPM. La solución reguladora puede decantarse entonces. De acuerdo con una modalidad preferida, la solución amortiguadora es solución amortiguadora fosfatada. De acuerdo con una modalidad, el método comprende el paso de medir el pH de la membrana placentaria después del tratamiento con la solución amortiguadora. De acuerdo con una modalidad, los pasos de añadir una solución amortiguadora, agitar y decantar pueden repetirse hasta que el pH de la membrana placentaria se sitúe entre alrededor de 6,8 y alrededor de 7,2.

De acuerdo con una modalidad, el método comprende el paso de enjuagar la membrana placentaria con agua. De acuerdo con una modalidad, la membrana placentaria se lava una vez con agua. De acuerdo con una modalidad, el paso de enjuagar se lleva a cabo múltiples veces con agua. De acuerdo con una modalidad, la membrana placentaria se enjuaga desde alrededor de dos veces a alrededor de cinco veces con agua.

Cuando se prepara un constructo a base de membrana, la membrana placentaria puede estar húmeda o deshidratada. De acuerdo con una modalidad, la membrana placentaria puede deshidratarse por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, deshidratación química (v.g., solventes orgánicos), liofilización, desecación, deshidratación en estufa y secamiento por aire. De acuerdo con una modalidad preferida, el método comprende el paso de añadir o introducir un alcohol a la membrana placentaria para cubrir toda la superficie de la membrana placentaria (es decir, sumergir la membrana placentaria). De acuerdo con una modalidad, el método comprende el paso de añadir o introducir desde alrededor de 1 mL a alrededor de 100 mL de alcohol por gramo de membrana placentaria. De acuerdo con una

modalidad, la membrana placentaria se sumerge completamente en el alcohol durante desde alrededor de diez minutos a alrededor de 24 horas. El alcohol puede ser cualquier alcohol seguro y apropiado para contacto con la membrana placentaria. De acuerdo con una modalidad particular, el alcohol es etanol. De acuerdo con una modalidad, el método comprende el paso de decantar o drenar el alcohol de la membrana placentaria.

De acuerdo con una modalidad, el método comprende el paso de extender la membrana placentaria sobre una mesa de secado (v.g., una mesa de secado Delrin). De acuerdo con una modalidad, la membrana placentaria puede secarse (*may be blotted*) con una toallita absorbente de microfibra o similar. La membrana placentaria puede extenderse en una manera que deshidrate completamente la membrana placentaria, garantizando al mismo tiempo que no surjan arrugas o burbujas.

Cuando se prepara un constructo a base de membrana, el método comprende el paso de cortar la membrana placentaria a un tamaño predeterminado o deseado. De acuerdo con una modalidad, la membrana placentaria se corta a un tamaño con una cuchilla giratoria u otro instrumento apropiado. De acuerdo con una modalidad, los cortes se practican con una cuchilla de bisturí.

De acuerdo con otra modalidad, el método comprende el paso de formar una o más (v.g., una pluralidad) de estructuras porosas en la membrana placentaria. Por consiguiente, el andamio resultante incluye una superficie que define una o más estructuras porosas (v.g., orificios pasantes). De acuerdo con una modalidad, la membrana placentaria puede dotarse de una estructura porosa (*may be fenestrated*) con una cuchilla de bisturí u otro aparato, con la una o más estructuras porosas distanciadas apropiadamente para brindar una oportunidad suficiente para que el exudado producido por una herida pase a través de la membrana placentaria, manteniendo al mismo tiempo un área superficial de la membrana placentaria suficiente para tratar efectivamente un defecto, tal como una herida o una úlcera.

Los métodos de procesamiento provistos aquí tienen como resultado un andamio de mamífero que comprende una matriz extracelular placentaria descelularizada, tal como una matriz extracelular placentaria porcina descelularizada, que se deriva de la membrana placentaria.

De acuerdo con una modalidad, el método comprende el paso de poner el andamio cortado en uno o más materiales de empaque.

De acuerdo con una modalidad, el método comprende el paso de esterilizar terminalmente el andamio empaquetado. De acuerdo con una modalidad, el método de esterilización terminal puede ser irradiación por haz de electrones, irradiación gama,

tratamiento con ácido peracético, tratamiento con ácido peracético vaporizado (VPA- *vaporized peracetic acid*), cualquier combinación de los anteriores, o cualquier otro método de esterilización terminal conocido en la técnica.

De acuerdo con otra modalidad, el andamio se formula como un constructo a base de polvo. Cuando se prepara el constructo a base de polvo, el andamio puede estar húmedo o deshidratado. De acuerdo con una modalidad, el andamio puede deshidratarse por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, deshidratación química (v.g., solventes orgánicos), liofilización, desecación, deshidratación en estufa y secamiento por aire. En una modalidad, el método comprende el paso de cortar el andamio en una pluralidad de tiras. De acuerdo con una modalidad, las tiras del andamio pueden ponerse luego en un molino y triturarse hasta obtener un polvo para formar un constructo a base de polvo. De acuerdo con una modalidad, el andamio puede estar compuesto por toda la membrana placentaria o por una porción de la misma, las cuales pueden ponerse en un molino y triturarse hasta obtener un polvo para formar a constructo a base de polvo. De acuerdo con una modalidad, el constructo a base de polvo puede ponerse luego en recipientes apropiados o frasquitos en una concentración deseada. De acuerdo con una modalidad, el método de preparar un constructo a base de polvo comprende el paso de liofilizar el constructo a base de polvo en los frasquitos para eliminar la humedad residual. A continuación, los frasquitos que contienen el constructo a base de polvo se esterilizan terminalmente. De acuerdo con una modalidad, el método de esterilización terminal puede ser mediante irradiación con haz de electrones, irradiación gamma, tratamiento con ácido peracético, tratamiento con ácido peracético vaporizado (VPA), cualquier combinación de los anteriores, o cualquier otro método de esterilización terminal conocido en la técnica.

Se provee igualmente un método de tratar un defecto. De acuerdo con una modalidad, el método comprende el paso de suministrar un andamio porcino, tal como se provee aquí. El andamio porcino se administra entonces a (v.g., se pone sobre, o alrededor de) un defecto. El defecto puede ser un defecto de tejido blando, incluyendo una herida tal como, por ejemplo, una quemadura, un corte, o una abrasión. De acuerdo con una modalidad, el defecto se selecciona de una herida de espesor parcial, herida de espesor total, úlcera por presión, úlcera venosa, úlcera diabética, úlcera vascular crónica, herida tunelizada o socavada, herida quirúrgica, dehiscencia de la herida, abrasión, laceración, quemadura de segundo grado, desgarramiento de la piel y herida drenante. El defecto puede ser también cualquier úlcera. De acuerdo con una modalidad, la herida puede ser un sitio quirúrgico en cualquier parte sobre, o en, un cuerpo de mamífero. El andamio porcino puede ponerse sobre un sitio quirúrgico o

mantenerse en su sitio por una musculatura o piel del paciente. Suturas o ganchos pueden usarse igualmente para mantener en su sitio un andamio porcino a base de membrana. El andamio porcino puede hidratarse en el sitio de aplicación durante el tratamiento. El andamio porcino puede usarse además como un implante. El andamio porcino puede usarse también para cubrir un implante u otro dispositivo que pueda colocarse sobre, o dentro de, un organismo de mamífero.

De acuerdo con una modalidad, los andamios porcinos provistos aquí son útiles en conjunción con procedimientos quirúrgicos generales para contribuir a la cascada de cicatrización, reducir las adhesiones y disminuir el dolor/inflamación. Tales procedimientos quirúrgicos generales incluyen, pero no se limitan a, reconstrucción de mama, reparación de hernias/reconstrucción de la pared abdominal/reconstrucción fascial, y sitios de injerto de derivación vascular. De acuerdo con una modalidad, los andamios porcinos provistos aquí son útiles como hemostáticos o pegamentos biológicos.

De acuerdo con una modalidad, los andamios porcinos provistos aquí son útiles para el tratamiento, reducción y prevención de la formación de cicatrices. Tal formación de cicatrices puede ser el resultado de un trauma o un procedimiento quirúrgico. El procedimiento quirúrgico incluye cualquier procedimiento que pueda tener como resultado la formación de cicatrices (*scarring*). De acuerdo con una modalidad, los andamios porcinos provistos aquí son útiles en cirugías neurológicas para ayudar en la regeneración o reparación de los nervios, actuar como un sustituto dural, conducto nervioso, envoltura nerviosa o en conjunción con la reparación de un aneurisma. De acuerdo con una modalidad, los andamios porcinos provistos aquí son útiles en cirugías ortopédicas (v.g., lesiones relacionadas con la práctica de deportes infligidas a los músculos, ligamentos y tendones; cirugías relacionadas con los huesos (v.g., columna vertebral), reemplazo total de articulaciones, laminectomías (barrera anti-adhesión), reparación de tendones/ligamentos, reparación de nervios, osteoartritis, reparación de cartílago, e injertos de hueso). De acuerdo con una modalidad, los andamios porcinos provistos aquí son útiles en cirugía colorrectal tal como anastomosis de colon o reparación de fístulas. De acuerdo con una modalidad, los andamios porcinos provistos aquí son útiles en cirugías cosméticas como un relleno dérmico o para ayudar en la reducción de las arrugas de la piel, recuperación o reposición de la superficie cutánea, rejuvenecimiento de la piel, y demás fines cosméticos.

De acuerdo con una modalidad, los andamios porcinos provistos aquí son útiles en cirugías cardiovasculares en conjunción con un parche pericárdico, válvulas coronarias del corazón, o injerto vascular. De acuerdo con una modalidad, los andamios porcinos provistos aquí son útiles en neumología para reparación pulmonar.

De acuerdo con una modalidad, los andamios porcinos provistos aquí son útiles para el tratamiento y reducción de cicatrices existentes (v.g., revisión de cicatrices). Particularmente, los andamios porcinos provistos aquí pueden usarse para mejorar o reducir el aspecto de las cicatrices, restaurar la función de la piel y corregir cambios de la piel (desfiguración), tales como las causadas por una lesión, herida, o cirugía previa. De acuerdo con una modalidad, los andamios porcinos descritos aquí pueden usarse como un apósito para ayudar en la curación y prevención de cicatrices, tales como las asociadas con la eliminación del cáncer (v.g., cirugía de Mohs).

De acuerdo con una modalidad, los andamios porcinos provistos aquí son útiles para el tratamiento de defectos en la oreja, nariz, boca o garganta, tal como en el tratamiento de fístulas orales o reparación del septo. En algunas modalidades, los andamios porcinos provistos aquí son útiles para el tratamiento de defectos dentales tales como en la envoltura de implantes dentales (*the wrapping of dental implants*), el tratamiento del defecto de recesión gingival avanzada, la reconstrucción del paladar blando, defectos periodontales, o la reparación guiada de tejido. De acuerdo con una modalidad, los andamios porcinos provistos aquí son útiles para el tratamiento de afecciones oftalmológicas (v.g., reparación de la superficie ocular, queratitis, úlcera corneal/queratoconjuntivitis, o pterigio). De acuerdo con una modalidad, los andamios porcinos provistos aquí son útiles para el tratamiento de varias aplicaciones ginecológicas y urológicas tales como en la reparación ureteral, histerectomía, fibrosis uterina, incontinencia urinaria, o prolapso vaginal.

Aunque modalidades específicas de la presente invención se ilustran aquí y se describen en detalle, la invención no se limita a ellas. Las descripciones detalladas que anteceden se proveen como ejemplares de la presente invención y no deben interpretarse como constituyendo alguna limitación de la invención. Modificaciones serán obvias a los expertos en la materia, y todas las modificaciones que no se aparten del espíritu de la invención tienen como finalidad incorporarse en el alcance de las reivindicaciones incluidas al final.

Análisis Bioquímico

Se condujo un extensivo análisis bioquímico en una modalidad de un andamio porcino, tal como se provee aquí. Los resultados indicaron que el andamio porcino estaba constituido ante todo por cuatro componentes principales de matriz extracelular: colágeno, elastina, ácido hialurónico y glicosaminoglicanos sulfatados (sGAGs). Las cantidades específicas se enumeran en la siguiente Tabla I:

Tabla I: Principales Componentes ECM del Andamio Porcino

Componente ECM	Cantidad (%p/p)
Colágeno Total	77% $\pm$ 8%
Elastina	9% $\pm$ 1%
Ácido Hialurónico (HA)	2% $\pm$ 0,5%
GAGs Sulfatados (sGAG)	1% $\pm$ 0,4%

La proporción de Colágeno I a Colágeno III y el contenido resultante de Colágeno I y III por masa en el andamio porcino se indican en la siguiente Tabla II. Para este análisis, la cantidad de colágeno total de 77% indicada en la Tabla II se asumió compuesta principalmente por Colágeno I y III.

Tabla II: Proporción I:III del Colágeno del Andamio Porcino

Proporción I:III del Colágeno	2,15 $\pm$ 0,11
Colágeno I	53% (%p/p)
Colágeno III	24% (%p/p)

El ensayo ELISA se empleó para cuantificar la fibronectina hallada en el andamio porcino (EJEMPLO 5). Los resultados indicaron que el andamio porcino contenía una cantidad promedio de 1521,3 $\pm$ 112,8 nanogramos de fibronectina por gramo de andamio porcino.

El análisis bioquímico de composición de una modalidad del andamio porcino fabricado por los métodos provistos aquí indicó una matriz extracelular con un potencial regenerativo óptimo. Una persona experta en la materia entiende la evolución de productos regenerativos para el cuidado de heridas de los fabricados de colágeno purificado a los fabricados de estructuras más complejas de matriz extracelular con componentes de matriz extracelular biológicamente importantes, intactos (v.g., elastina, fibronectina, glicosaminoglicanos y otras moléculas de la matriz extracelular). Los productos de colágeno purificado, por definición, (Cassel & Kanagy, 1949) tienen un potencial regenerativo limitado porque un mayor contenido de colágeno tiene invariablemente como resultado la disminución de moléculas de matriz extracelular no colágenas con potencial regenerativo. Las moléculas de matriz extracelular no colágenas, tales como elastina, fibronectina, ácido hialurónico, GAGs sulfatados y otras moléculas, pueden actuar concertada o individualmente para crear un entorno mejor de curación de la herida. Un experto en la materia entiende que los biomateriales derivados de fuentes naturales de matriz extracelular, las cuales son muy densas en colágeno (v.g., tendón, dermis), son mecánicamente fuertes, pero brindan un potencial regenerativo desdeñable; y que los biomateriales derivados de fuentes naturales de matriz extracelular que son menos densos en colágeno con niveles más altos de componentes no colágenos (v.g., vejiga urinaria,

pericardio, peritoneo) tienden a tener propiedades más regenerativas debido a sus niveles más altos de componentes de matriz extracelular no colágenos. A tal fin, el andamio porcino, tal como se provee aquí, conserva una elevada cantidad de componentes de matriz extracelular no colágenos, los cuales contribuyen con sus capacidades de curación de las heridas, cuando se comparan con otros biomateriales comercializados, derivados de fuentes naturales de matriz extracelular. Por ejemplo, el colágeno total promedio (la suma de colágeno soluble y colágeno insoluble) del presente andamio porcino es aproximadamente 77% p/p. El colágeno total promedio del producto ECM comercializado es aproximadamente 94% p/p. Aunque ambos pueden considerarse biomateriales colágenos porque cada uno de ellos está compuesto principalmente de colágeno, el hecho de que el presente andamio porcino contiene menos colágeno, y más componentes principales de matriz extracelular no colágenos combinados, los cuales incluyen ácido hialurónico, glicosaminoglicanos sulfatados, elastina y fibronectina, indica un biomaterial regenerativo más potente, comparado con el producto ECM comercializado.

Moléculas No Colágenas en el Andamio Porcino

Los glicosaminoglicanos (GAGs) son carbohidratos complejos que se expresan omnipresente y abundantemente en la superficie celular y en la matriz extracelular. La diversidad estructural de los GAGs posibilita la interacción con una amplia variedad de moléculas biológicas y facilita numerosas funciones en la matriz extracelular para regular las propiedades mecánicas de un tejido, incluyendo la proliferación celular, la adhesión celular, la señalización de los factores de crecimiento, la función de las células inmunitarias y la estructura del colágeno. Cinco GAGs polidispersos complejos, lineales, se producen en los sistemas mamíferos. El ácido hialurónico (HA) es un GAG no sulfatado, mientras que los GAGs sulfatados incluyen: sulfato de condroitina (CS), dermatán sulfato (DS), heparán sulfato (HS) y queratán sulfato (KS). Los GAGs sulfatados se unen a una proteína central (*a protein core*) para formar proteoglicanos (PG), mientras que el GAG no sulfatado, el ácido hialurónico, puede existir como una cadena GAG.

Ácido Hialurónico (GAG No Sulfatado)

El ácido hialurónico es un carbohidrato natural y lineal compuesto por beta-1,3-N-acetil glicosamina y ácido beta-1,4-glucorónico que repiten unidades disacárido con un peso molecular de hasta 6 MDa (WO 2010/003797 A1). El ácido hialurónico se distribuye ampliamente por todo el tejido conectivo, los tejidos neural y epitelial y es conocido por su capacidad de jugar un papel importante en promover la cicatrización de las heridas y la

regeneración tisular (Chen Wound Rep Reg 1999; Litwiniuk Wounds 2016; Kessiena Wound Rep Reg 2014). El ácido hialurónico se encuentra igualmente involucrado en todas las etapas de reparación del tejido extracelular: en la granulación inflamatoria, en las etapas de re-epitelialización y cicatrización de heridas (EP 1 948 200 B1). El ácido hialurónico es además conocido como hialuronano, hialuronato, o HA. Los términos ácido hialurónico y HA pueden emplearse indistintamente aquí.

Se descubrió que el contenido de glicosaminoglicano (GAG) de las placentas porcinas a lo largo de la segunda mitad de gestación era aproximadamente 60 µg/mg (0,06 g/g), y en la última etapa de gestación, el ácido hialurónico representaba aproximadamente 64% del contenido GAG total (Steele 1980). Usando estos datos, el contenido promedio de ácido hialurónico de la placenta porcina a término es típicamente alrededor de 38,4 µg/mg (0,038 g/g) y los restantes GAGs sulfatados representan 21,6 µg/mg (0,022 g/g) a término.

El andamio porcino, tal como se provee aquí, demostró retener por lo menos alrededor de 0,02 gramos de ácido hialurónico por gramo de andamio porcino (véase EJEMPLO 6). Esta medida representa una retención de alrededor de 50% en el contenido de ácido hialurónico del andamio porcino postprocesamiento. En consecuencia, el andamio porcino tal como se provee aquí conserva por lo menos alrededor de 50% p/p de cualquier ácido hialurónico presente en la membrana placentaria porcina nativa. La retención del contenido de ácido hialurónico en el andamio porcino presenta resultados sorprendentes en vista de los métodos de preparación provistos aquí.

La descelerización de matrices extracelulares puede lograrse por diferentes tratamientos químicos que se conocen en la técnica, algunos de los cuales son conocidos por retirar GAGs durante el proceso de descelerización: álcalis/ácidos; detergentes no iónicos (v.g., Triton X-100); detergentes iónicos (v.g., dodecil sulfato de sodio (SDS)); ciertas enzimas (v.g., nucleasas) (Gilbert Biom 2006). De acuerdo con los métodos divulgados aquí, el andamio porcino puede prepararse por un método que comprende un paso de tratar una membrana placentaria porcina con un detergente iónico. De acuerdo con los métodos divulgados aquí, el andamio porcino puede prepararse por un método que comprende un paso de tratar una membrana placentaria porcina con un paso de tratamiento con álcalis/ácidos (solución de álcali-hidróxido de sodio). A pesar de estos métodos de preparación, divulgados aquí, se preserva un alto contenido (por lo menos alrededor de 50% p/p) de ácido hialurónico de un tejido placentario porcino crudo en el andamio porcino resultante.

El andamio porcino tal como se provee aquí contiene niveles significativamente elevados de ácido hialurónico, cuando se compara con otros productos de matriz extracelular

comercialmente disponibles. Por ejemplo, el andamio porcino, tal como se provee aquí, contiene alrededor de diez (10) veces más ácido hialurónico sobre una base por gramo (p/p), comparado con otros productos de matriz extracelular comercialmente disponibles, incluyendo, por ejemplo, uno que tiene como fuente la submucosa del intestino delgado porcino (producto ECM comercializado) y uno que tiene como fuente el tejido de nacimiento humano. El producto ECM comercializado contenía aproximadamente 0,002 g de ácido hialurónico por gramo de producto (véase EJEMPLO 6); y el aloinjerto de la membrana amniótica/coriónica humana deshidratada contenía así mismo aproximadamente 0,002 g de ácido hialurónico por gramo de producto, según datos publicados del fabricante (Lei Adv Wound Care 2016).

GAGs Sulfatados

Las cadenas laterales de GAG sulfatados de proteoglicanos son macromoléculas muy importantes en todas las fases de la cicatrización de heridas (Ghatak, S. et al.). Durante la fase de proliferación de la cicatrización de heridas, fibroblastos y células mesenquimales penetran el sitio inflamatorio de la herida en respuesta a factores de crecimiento que son necesarios para la estimulación de la proliferación celular. Los fibroblastos sintetizan colágeno y proteoglicanos, y tal proceso continúa durante varias semanas con aumentos proporcionales de colágeno. Durante este tiempo, las células endoteliales forman capilares, y los niveles de GAGs (ácido hialurónico, sulfato de condroitina (CS) y dermatán sulfato (DS)) varían también. Durante las dos semanas iniciales, el ácido hialurónico se sintetiza en grandes cantidades por los fibroblastos, seguidos por niveles cada vez mayores de proteoglicanos DS y CS. Gradualmente, cuando la proliferación de las células alcanza cierta estabilidad (*a plateau*), se elevan los niveles de proteoglicano heparán sulfato (HS) en la herida. Los proteoglicanos sulfatados con CS y DS contribuyen a la polimerización del colágeno, y los proteoglicanos HS en las células pueden crear anclajes a la matriz circundante. La degradación de proteoglicanos por proteasas en las heridas puede liberar fragmentos de péptidos-GAG, los cuales pueden modular el proceso de cicatrización de la herida. Por ejemplo, CS y DS pueden regular la actividad de los factores de crecimiento y pueden estimular la producción de óxido nítrico, lo que, a su vez, puede modular la angiogénesis; mientras que el HS puede estimular la liberación de IL-1, IL-6, PGE2, y TGF- β y contribuir a la modulación de sus efectos proangiogénicos en los tejidos. Por lo demás, se piensa que los GAGs sulfatados como parte de los proteoglicanos juegan un papel en el ensamblado de fibras y fibrillas de colágeno (Michelacci, Y.M.) debido a las interacciones electrostáticas entre sitios cargados positivamente en las moléculas de colágeno y los GAGs cargados negativamente.

El andamio porcino, tal como se provee aquí, contiene o mantiene de otro modo aproximadamente 0,01 gramos de GAGs sulfatados por gramo andamio porcino (véase EJEMPLO 7), lo cual representa por lo menos alrededor de 45% de retención en el contenido de GAGs sulfatados postprocesamiento. Por consiguiente, el andamio porcino conserva por lo menos alrededor de 45% de cualesquiera GAGs sulfatados presentes en la membrana placentaria porcina nativa. Similar a la retención del ácido hialurónico descrita más arriba, aproximadamente la mitad (v.g., por lo menos alrededor de 50% p/p) del contenido de GAGs sulfatados se retiene en el andamio porcino final. Por lo tanto, procesar la membrana placentaria porcina de acuerdo con los métodos provistos aquí preserva por lo menos alrededor de 50% p/p del contenido inicial tanto de los GAGs sulfatados como de los no sulfatados provenientes de la membrana placentaria porcina nativa en el andamio porcino final.

Elastina

La elastina es una proteína de la matriz extracelular que proporciona elasticidad y resiliencia a muchos tipos de tejido y juega un papel crítico en la cicatrización de heridas, induciendo una gama de actividades celulares, entre las que se cuentan la migración y la proliferación celular, la síntesis de la matriz y la producción de proteasa (Almine, Wise, & Weiss, 2012). Dadas sus propiedades mecánicas y señalizadoras, la elastina desempeña un papel multifuncional en la cicatrización de heridas (Almine et al., 2013). El andamio porcino, tal como se provee aquí, contiene o conserva de otro modo aproximadamente 0,09 gramos de elastina por gramo de andamio porcino, lo cual representa por lo menos alrededor de 66% de retención en el contenido de elastina postprocesamiento (véase EJEMPLO 4). Por consiguiente, el andamio porcino conserva por lo menos alrededor de 66% de cualquiera elastina presente en la membrana placentaria porcina nativa.

Fibronectina

La fibronectina es una glicoproteína adhesiva que juega un papel crucial en la cicatrización de heridas, particularmente en la formación de la matriz extracelular y en la re-epitelialización (Lenselink, 2013). El andamio porcino, tal como se provee aquí, contiene o conserva en otra forma aproximadamente 1520 nanogramos de fibronectina por gramo de andamio porcino (véase EJEMPLO 5). El producto ECM comercializado contiene aproximadamente 139 nanogramos de fibronectina por gramo de producto ECM comercializado, lo cual equivale a aproximadamente 9% de la concentración de fibronectina promedio hallada en el andamio porcino. En consecuencia, el andamio porcino tiene por

encima de diez (10) veces más fibronectina sobre una base por ng/g (p/p), comparado con el producto ECM comercializado.

El andamio porcino, tal como se provee aquí, conserva una alta cantidad de componentes no colágenos de la matriz extracelular que contribuyen en sus capacidades de cicatrización de heridas, cuando se compara con otros biomateriales comercializados derivados de otras fuentes naturales de matriz extracelular. El andamio porcino, tal como se provee aquí, contiene niveles más altos de varias moléculas de matriz extracelular no colágenas, incluyendo ácido hialurónico, elastina y fibronectina, lo cual sugiere un biomaterial regenerativo más potente, comparado con el producto ECM comercializado.

Descelularización del Andamio Porcino

La apropiada descelularización de matrices extracelulares es crítica para la función del producto de matriz extracelular final. El objetivo de la descelularización es retirar las células y eliminar material genético residual, preservando al mismo tiempo los componentes de la matriz extracelular y conservando las propiedades del tejido base (Gilpin & Yang 2017). Se ha demostrado que la descelularización incompleta disminuye la proporción de macrófagos activados M2 a macrófagos activados M1, cuando se compara con métodos de descelularización más completa (Keane et al., 2012). Estudios adicionales han demostrado que proporciones más elevadas de macrófagos activados M2 a macrófagos activados M1 promueven en mayor medida las actividades de inmunomodulación, mecanismos constructivos y remodelación (Sicari et al, 2014).

Un experto en la materia entiende que las células pueden retirarse del tejido usando métodos físicos, métodos químicos, métodos enzimáticos, métodos inhibidores de proteasas, o métodos antibióticos. Independientemente del método de remoción, se hace una determinación de la eficiencia de la descelularización. Un método común de verificar el retiro de las células es mediante el uso de tinción histológica. Hematoxilina y eosina (H&E) y DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) se han utilizado exitosamente para cuantificar las células restantes y el contenido nuclear, respectivamente, de tejidos procesados (Gilbert et al., 2006; Oliveira et al., 2013).

El ensayo de desechos celulares se condujo en placentas porcinas lavadas, crudas, además del andamio porcino, con el fin de caracterizar la capacidad del proceso de fabricación del andamio porcino para retirar el material celular y generar un tejido "limpio".

Se usó la tinción con hematoxilina y eosina (H&E) para determinar la presencia de células y desechos celulares. Así mismo, se empleó tinción con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para la evaluación de núcleos intactos. El tejido placentario porcino crudo de partida contenía

abundantes células intactas y núcleos en todo el tejido. Por el contrario, el andamio porcino no contenía células visibles intactas ni núcleos. En consecuencia, el proceso de fabricación del andamio porcino es un proceso efectivo de descelularización.

Adicionalmente, se cuantificó el ADN residual/ácido nucleico en el andamio porcino usando el IT PicoGreen Assay, proporcionando residuos bioquímicos que correspondían a cantidades minúsculas ($1115,0 \pm 137,0$ ng/mg por andamio porcino). Métodos de ensayo detallados se discuten en los EJEMPLOS 2 y 3.

EJEMPLO 1

Análisis de Herovici – Análisis Semicuantitativo de la Proporción de Colágeno I a Colágeno III

El objetivo de este estudio era evaluar la proporción de Colágeno I a Colágeno III en: (i) andamios porcinos preparados de tres razas de cerdos (Raza 1, Raza 2, y Raza 3); y el producto ECM comercializado. La proporción del Colágeno I a Colágeno III se evaluó mediante análisis semicuantitativo de la Tinción de Herovici. El ensayo se realizó de conformidad con los requerimientos claves de los estándares regulatorios de Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP - *Good Laboratory Practice*).

Métodos:

Muestras de cada artículo de ensayo se fijaron en formalina tamponada neutra al 10%, embebidas en parafina, y se cortaron secciones de 5 µm de espesor sobre portaobjetos usando métodos conocidos en la técnica. Cuatro secciones de 5 µm por artículo de ensayo se cortaron a cada portaobjetos. Los portaobjetos se tiñeron. Dos conjuntos de portaobjetos se tiñeron usando el protocolo de Herovici, cada conjunto teñido como un lote independiente. Se cuantificó la proporción de rosado (Colágeno I) a azul (Colágeno III) para cuatro secciones en cada portaobjetos del microscopio Nikon Eclipse E600 y objetivo 20X usando el Cri Nuance FX Multispectral Imaging System. Los resultados se resumen en las Tablas III y IV.

Resultados:

Tabla III

Muestra		Proporción Col I: Col III	SE
Andamio porcino	Raza 1	2,27	0,49
	Raza 2	2,04	0,35
	Raza 3	2,12	0,26

Producto ECM comercializado	2,61	0,49
-----------------------------	------	------

Tabla IV

Muestra	Proporción Col I: Col III	SE
Andamio porcino: promedio de tres razas	2,15	0,22
Producto ECM comercializado	2,61	0,49

Conclusión:

La tinción de Herovici proporcionó un método para un análisis semicuantitativo de la proporción de Colágeno I a Colágeno III en muestras de tejido (Turner et al, 2013). La cuantificación de Herovici de los artículos de ensayo mostró que la proporción de Colágeno I: Colágeno III era $2,15 \pm 0,22$ para los andamios porcinos; y $2,61 \pm 0,49$ para el producto ECM comercializado.

Se efectuó un análisis de varianza de una vía de Kruskal-Wallis en rangos con todos los procedimientos de comparación múltiple de dos en dos (Método de Dunn) en los datos y evidencia que para las proporciones de Colágeno I: Colágeno III no hubo diferencias estadísticas entre el producto ECM comercializado y cualquiera de los tres grupos de andamios porcinos preparados de la Raza 1, Raza 2 y Raza 3.

EJEMPLO 2**Evaluación de los Desechos Celulares****Objetivo:**

El objetivo de este estudio era evaluar la magnitud de los desechos celulares presentes en: (a) andamios porcinos fabricados de placenta de una de tres razas de cerdos (Raza 1, Raza 2, y Raza 3) y (b) producto ECM comercializado, con material celular presente en placentas lavadas crudas de las tres razas (Raza 1, Raza 2, y Raza 3) sirviendo como tejido control. El ensayo se efectuó de conformidad con los requerimientos claves de los estándares regulatorios de Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP).

Métodos:

Muestras de cada artículo de ensayo se fijaron en formalina tamponada neutra al 10%, embebidas en parafina, y se cortaron secciones de 5 µm de espesor sobre portaobjetos. Se cortaron dos secciones de 5 µm por artículo de ensayo a cada portaobjetos. Un portaobjeto de

cada muestra se desparafinó y se tiñó con Hematoxilina y Eosina (H&E); un portaobjetos de cada muestra tipo se desparafinó y se tiñó con DAPI-Fluoromount-G Slide Mounting Medium (Southern Biotech # 010020), en donde DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) es una tintura de ADN azul-fluorescente que exhibe una mejora de ~20 veces la fluorescencia después de unirse a las regiones AT del ADN bicatenario. Los portaobjetos se fotografiaron en el microscopio Zeiss Observer Z1 usando la cámara AxioCam MRc.

Resultados:

Los artículos de ensayo se tiñeron con H&E y se fotografiaron con ampliaciones 32X para evaluar la presencia de células y desechos celulares. Adicionalmente, los artículos de ensayo se tiñeron con DAPI y se fotografiaron a 10X y 32X para evaluar la presencia de núcleos intactos. El análisis de los portaobjetos teñidos con H&E mostraron que: (i) las muestras de placenta porcina lavada cruda de las tres razas de cerdos (Raza 1, Raza 2, y Raza 3) contenían material celular que aparece como células intactas por todo el tejido, tal como se esperaría para el tejido placentario nativo; y (ii) los artículos de ensayo del andamio porcino fabricado de la placenta de una de las tres razas de cerdos (Raza 1, Raza 2, y Raza 3) contenían material celular en ciertas áreas pero no por todo el tejido; y (iii) el producto ECM comercializado contenía material celular por todo el tejido. Mientras mucho del material celular observado en el producto ECM comercializado parecía ser del tamaño y la forma esperados para células intactas, el material celular observado en los artículos de ensayo del andamio porcino provenientes de Raza 1, Raza 2 y Raza 3 pareció ser menor que las células intactas.

El análisis de los portaobjetos teñidos con DAPI muestra que: (i) las muestras de placenta lavada cruda de las tres razas contenía núcleos intactos por todos los tejidos, tal como se esperaría para tejido placentario nativo, (ii) no se hicieron visibles núcleos intactos en los artículos de ensayo del andamio porcino fabricado de las tres razas (Raza 1, Raza 2, y Raza 3); y (iii) el producto ECM comercializado contenía núcleos intactos por todo el tejido.

El análisis de tejidos teñidos con H&E y DAPI indicó que el material celular presente en los artículos de ensayo del andamio porcino eran desechos celulares y no contenían células intactas, y que el producto ECM comercializado contenía células intactas por todo el tejido.

Conclusión:

Cuando se comparan residuos celulares que pueden plantear un riesgo de inmunogenicidad o inflamación, el andamio porcino se considera un material más seguro que el producto ECM comercializado. El andamio porcino no presentó células intactas ni núcleos,

mientras que el producto ECM comercializado contenía numerosas células intactas y núcleos por toda su estructura.

EJEMPLO 3

Cuantificación y Análisis de Ácido Nucleico

Objetivo:

El objetivo de este estudio era cuantificar los ácidos nucleicos (por contenido de ADN) en: (i) andamios porcinos fabricados de la placenta de una de tres diferentes razas de cerdos (Raza 1, Raza 2, y Raza 3).; y (ii) producto ECM comercializado. El ensayo se efectuó de conformidad con los requerimientos claves de los estándares regulatorios de Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP).

Métodos:

Se extrajo ADN de muestras siguiendo los métodos conocidos en la técnica. ADN bicatenario (dsDNA - *double-stranded DNA*) se cuantificó usando el Ensayo Quant-IT PicoGreen (Invitrogen, Carlsbad CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todas las muestras se analizaron en triplicado. Por lo demás, las muestras del grupo de ensayo se analizaron simultáneamente para garantizar la aceptabilidad de los datos debido a la sensibilidad del ensayo. Los resultados se resumen en la Tabla V.

Resultados:

A. Resultados de la Cuantificación PicoGreen

Tabla V

Muestra		ng ADN por mg peso en seco	SD
Andamio porcino	Raza 1	1020,05	128,01
	Raza 2	1111,01	111,91
	Raza 3	1213,94	111,06
Producto ECM comercializado		2322,59	41,75

Conclusiones:

Cada uno de los andamios porcinos de una de las tres razas de cerdos (Raza 1, Raza 2, y Raza 3) contiene aproximadamente 1000 a 1200 ng de dsDNA por mg peso en seco. El producto ECM comercializado contiene por encima de 2300 ng de dsDNA por mg peso en

seco. El contenido de dsDNA de cada una de las tres muestras del andamio porcino es aproximadamente la mitad del contenido del dsDNA del producto ECM comercializado.

Estos resultados, combinados con los resultados del EJEMPLO 2 (Evaluación de los Desechos Celulares), indican que el proceso de fabricación del andamio porcino es un proceso de descelularización más efectivo que el producto ECM comercializado. El andamio porcino es más limpio y más seguro en relación con material celular residual y el ácido nucleico, comparado con el material placentario porcino crudo y el producto ECM comercializado.

EJEMPLO 4

Cuantificación de Elastina

Objetivo:

El objetivo de este estudio era medir el contenido de elastina en: (i) andamios porcinos fabricados de la placenta de una de tres diferentes razas de cerdos (Raza 1, Raza 2, y Raza 3); (ii) placentas lavadas crudas de las mismas tres razas; y (iii) producto ECM comercializado. El ensayo se efectuó de conformidad con los requerimientos claves de los estándares regulatorios de Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP).

Métodos:

Cada muestra de ensayo de andamio porcino se preparó para obtener un polvo de un grupo (*pool*) de andamios porcinos derivados de seis cerdas individuales de la misma raza. Cada muestra de ensayo de placenta lavada cruda se preparó para obtener un polvo de un grupo de placentas derivado de tres cerdas individuales de la misma raza. El material placentario crudo se preparó para ensayo de material placentario congelado: las placentas porcinas congeladas se descongelaron, se enjuagaron por poco tiempo en agua desionizada tres veces, se cortaron, liofilizaron y, por último, se redujeron a polvo. Todo el material liofilizado se redujo a polvo usando un Molino Wiley Mini a través de un filtro de malla #40 por métodos conocidos comúnmente en la técnica. Se preparó un extracto de cada muestra del grupo (*each pooled sample*) y cada extracto se analizó en triplicado.

Todas las muestras se cuantificaron con respecto al contenido de elastina usando el Fastin Elastin Assay Kit from Biocolor (Biocolor # F2000; Batch Code # BB087). Se extrajo elastina de 6,3 mg de cada muestra. Los métodos de extracción y cuantificación de la muestra siguieron las instrucciones del fabricante. Los resultados se resumen en la Tabla VI.

Resultados:

Tabla VI

Muestra		µg elastina por mg de peso en seco	SD
Andamio porcino	Raza 1	65,67	9,42
	Raza 2	97,07	5,07
	Raza 3	94,88	4,22
Placenta nativa	Raza 1	138,51	5,43
	Raza 2	130,56	7,18
	Raza 3	117,70	12,17
Producto ECM comercializado		78,50	2,73

Conclusiones:

Se cuantificó elastina en (i) andamios porcinos fabricados de las tres razas (Raza 1, Raza 2, y Raza 3); (ii) placentas lavadas crudas de las mismas tres razas; y (iii) producto ECM comercializado.

Los andamios porcinos contenían entre aproximadamente 66 y 97 µg de elastina por mg de peso en seco de tejido. Las placentas lavadas crudas contenían entre aproximadamente 118 y 139 µg de elastina por mg de peso en seco de tejido. Puede concluirse que los andamios porcinos conservan un alto porcentaje de la elastina presente en el tejido nativo. El andamio porcino, tal como se provee aquí, contiene o mantiene en otra forma aproximadamente 0,09 gramos de elastina por gramo andamio porcino, lo cual representa una retención de por lo menos alrededor de 66% en el contenido de elastina postprocesamiento.

EJEMPLO 5

Cuantificación de Fibronectina

Objetivos:

El objetivo de este estudio era cuantificar la concentración de fibronectina en: (i) andamios porcinos fabricados de una de tres razas de cerdos (Raza 1, Raza 2, y Raza 3); (ii) placentas lavadas crudas de las mismas tres razas de cerdos; y (iii) producto ECM comercializado. El ensayo se efectuó de conformidad con los requerimientos claves de los estándares regulatorios de Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP).

Métodos:

Cada muestra de ensayo de andamio porcino se preparó para obtener un polvo de un grupo de andamios porcinos derivados de seis cerdas individuales de la misma raza. Cada

muestra de placenta lavada cruda se preparó para obtener un polvo de un grupo de placentas derivadas de tres cerdas individuales la misma raza. El material placentario crudo se preparó para ensayo de material placentario congelado: las placentas porcinas congeladas se descongelaron, se enjuagaron por poco tiempo en agua desionizada tres veces, se cortaron, liofilizaron y, por último, se redujeron a polvo. Todo el material liofilizado se redujo a polvo usando un Molino Wiley Mini a través de un filtro de malla #40. Se preparó un extracto de cada muestra del grupo (*each pooled sample*) y cada extracto se analizó en triplicado.

Las muestras se cuantificaron con respecto al contenido de fibronectina mediante ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*). Se prepararon extractos con PBS y extractos con urea-heparina de todas las muestras, y se corrieron ELISAs preliminares para determinar cuál preparación (extracción con PBS o extracción con urea-heparina) era más eficiente para la solubilización de cada molécula a cuantificarse. A continuación, se cuantificaron las muestras de los extractos apropiados. Se cuantificó fibronectina de los extractos urea-heparina de las muestras usando el LSBio Pig FN1 / Fibronectin ELISA, LSBio # LS-F8531. Todos los ensayos de cuantificación se corrieron en triplicado y se siguieron las instrucciones del fabricante. Los resultados se resumen en la Tabla VII.

Resultados:

Cuantificación de Fibronectina (FN)

Tabla VII

Muestra		Total ng FN por g de peso en seco	SD
Andamio porcino	Raza 1	1408,78	70,88
	Raza 2	1520,79	80,70
	Raza 3	1634,43	85,13
Placenta nativa	Raza 1	32667,85	1306,45
	Raza 2	35452,94	1347,52
	Raza 3	33187,87	873,04
Producto ECM comercializado		139,16	9,78

Conclusiones:

Se cuantificó fibronectina en: (i) andamios porcinos de tres razas (Raza 1, Raza 2, y Raza 3); (ii) placentas lavadas crudas de esas tres razas; y (iii) producto ECM comercializado.

Las placentas porcinas lavadas crudas contenían entre 32.000 y 35.500 ng de FN por gramo de tejido de peso en seco. La FN permaneció presente en los andamios porcinos preparados de las tres razas (Raza 1, Raza 2 y Raza 3), variando entre 1.409 y 1.634 ng FN por gramo de tejido de peso en seco. El producto ECM comercializado contenía 139 ng FN por gramo de tejido de peso en seco, aproximadamente 9% de la concentración de FN promedio en los andamios porcinos. En consecuencia, el andamio porcino tiene por encima de 10 veces más FN que el producto ECM comercializado.

EJEMPLO 6

Cuantificación del Ácido Hialurónico

Objetivo:

El objetivo de este estudio era medir el contenido de ácido hialurónico (HA) en: (i) andamios porcinos, cada uno fabricado de la placenta de una de tres razas de cerdos (Raza 1, Raza 2, y Raza 3); (ii) producto ECM comercializado; y (iii) matriz extracelular de la vejiga urinaria porcina (UECM – *urinary bladder extracelular matrix*) como control de ensayo. El ensayo se efectuó de conformidad con los requerimientos claves de los estándares regulatorios de Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP).

Métodos:

Cada muestra de ensayo de andamio porcino se preparó para obtener un polvo de un grupo de andamios porcinos derivado de seis cerdas individuales de la misma raza. Se preparó un extracto de cada muestra del grupo y cada extracto se analizó en triplicado.

Todas las muestras se cuantificaron con respecto al contenido de HA usando el Purple-Jelley Hyaluronan Assay Kit from Biocolor (Biocolor # H1000; Batch Code # BB031) y se prepararon de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los resultados se resumen en la Tabla VIII.

Resultados:

Tabla VIII

Muestra		mg HA por g de peso en seco	SD
Andamio porcino	Raza 1	16,98	0,65
	Raza 2	22,32	0,18

	Raza 3	11,83	0,19
Producto ECM comercializado		1,58	0,05
UECM (Control)		0,56	0,01

Conclusiones:

Los andamios porcinos, el producto ECM comercializado y la UECM contenían cada uno cantidades mensurables de ácido hialurónico (HA).

Los tres andamios porcinos, cada uno preparado de una raza diferente de cerdo (Raza 1, Raza 2, y Raza 3) contenían altos niveles de HA. El andamio porcino preparado de Raza 1 contenía 17,0 mg HA por gramo de tejido de peso en seco. El andamio porcino preparado de Raza 2 contenía 22,3 mg HA por gramo de tejido de peso en seco. El andamio porcino preparado de Raza 3 contenía 11,8 mg HA por gramo de tejido de peso en seco. Estas concentraciones revelaron que HA representaba 1,7%, 2,2% y 1,2% del peso en seco total de los andamios porcinos de Raza 1, Raza 2, y Raza 3, respectivamente.

El producto ECM comercializado contenía 1,58 mg HA por gramo de tejido de peso en seco, indicando que el HA representaba 0,16% del producto ECM comercializado en peso seco.

La UECM (control) contenía 0,562 mg HA por g de peso en seco, indicando que HA representaba 0,06% del peso en seco de tejido.

La cantidad promedio de HA en el andamio porcino era aproximadamente 0,02 g de HA por gramo de andamio porcino, mientras que la cantidad promedio de HA en el producto ECM comercializado era aproximadamente 0,002 g por gramo de producto ECM comercializado, indicando que el andamio porcino tenía aproximadamente diez (10) veces más ácido hialurónico que el producto ECM comercializado.

EJEMPLO 7**Cuantificación de Glicosaminoglicano (GAG) Sulfatado****Objetivo:**

El objetivo de este estudio era medir el contenido de glicosaminoglicanos (sGAG) sulfatados en: (i) andamios porcinos, cada uno fabricado de placenta de una de tres razas de cerdos (Raza 1, Raza 2, y Raza 3); (ii) producto ECM comercializado; y (iii) matriz extracelular de la vejiga urinaria porcina (UECM) como control de ensayo. El ensayo se efectuó de

conformidad con los requerimientos claves de los estándares regulatorios de Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP).

Métodos:

Todas las muestras se descompusieron (*were digested*) a 50 mg/ml en 2 ml con 0,1 mg/ml proteinasa K. Cada muestra de ensayo de andamio porcino se preparó para obtener un polvo de un grupo de andamios porcinos derivados de seis cerdas individuales de la misma raza. Se preparó un extracto de cada muestra del grupo y cada extracto se analizó en triplicado.

Los glicosaminoglicanos sulfatados se cuantificaron usando el Blyscan Sulfated Glycosaminoglycan Assay Kit from Biocolor (Biocolor # B1000; Batch Code # BB053) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados se resumen en la Tabla IX.

Resultados:

Tabla IX

Muestra		mg sGAGs por g de peso en seco	SD
Andamio porcino	Raza 1	14,64	0,79
	Raza 2	7,39	0,12
	Raza 3	8,33	0,23
Producto ECM comercializado		11,93	0,28
UECM		9,94	0,31

Conclusiones:

Los andamios porcinos, cada uno preparado de placenta de una de tres razas de cerdos (Raza 1, Raza 2, y Raza 3), el producto ECM comercializado y la UECM contenían cada uno cantidades mensurables de glicosaminoglicanos (sGAGs) sulfatados. La concentración promedio de sGAGs en los andamios porcinos era 10,12 mg sGAGs por gramo de tejido de peso en seco. La concentración de sGAGs en el producto ECM comercializado era 11,93 mg sGAGs por gramo de tejido de peso en seco. La concentración de sGAGs en la UECM era 9,94 mg sGAGs por gramo de tejido de peso en seco. Por consiguiente, la cantidad promedio de sGAGs en el andamio porcino era aproximadamente 0,01 g de sGAGs por gramo de andamio porcino, mientras que la cantidad promedio de sGAGs en el producto ECM comercializado era comparativamente 0,01 g de sGAGs por gramo de producto ECM comercializado.

EJEMPLO 8

Cuantificación del Colágeno (Soluble – Insoluble)

Objetivo:

El objetivo de este estudio era medir el contenido de colágeno en: (i) andamios porcinos, cada uno fabricado de placenta de una de tres razas de cerdos (Raza 1, Raza 2, y Raza 3); (ii) producto ECM comercializado; y (iii) matriz extracelular de la vejiga porcina urinaria (UECM) como control de ensayo. Se cuantificaron el colágeno soluble en pepsina-ácido frío y el colágeno insoluble en pepsina-ácido frío. El ensayo se efectuó de conformidad con los requerimientos claves de los estándares regulatorios de Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP).

Métodos:

Cada muestra de ensayo de andamio porcino se preparó para obtener un polvo de un grupo de andamios porcinos derivado de seis cerdas individuales de la misma raza. Se extrajo colágeno soluble en pepsina-ácido frío de cada muestra a 4°C de un día para otro con una muestra de 10 mg/ml en 0,1 mg/ml pepsina / 0,5 M de ácido acético y cada extracto se analizó en triplicado. Se preparó un extracto de cada muestra del grupo y cada extracto se analizó en triplicado. De los residuos de cada extracto restante luego de las extracciones con pepsina-ácido frío, el colágeno que no era soluble en pepsina-ácido frío se solubilizó con calor y, en seguida, se analizó en triplicado.

Colágeno se cuantificó usando el método de fijación Sircol Dye, con los kits de ensayo de colágeno de Biocolor (Biocolor # S4000 = CLRS1000 (Sircol Soluble Assay) y CLRS2000 (Sircol Insoluble Assay) Batch Code # BB084). Los métodos de extracción y cuantificación siguieron las instrucciones del fabricante. Los resultados se resumen en la Tabla X.

Resultados:

Tabla X

Colágeno Expresado como un % del Peso en Seco de Tejido					
Muestra		Colágeno Soluble	SD	Colágeno Insoluble	SD
Andamio porcino	Raza 1	1,60%	0,05%	68,27%	1,04%
	Raza 2	2,22%	0,02%	72,04%	0,77%
	Raza 3	2,73%	0,06%	83,06%	0,26%
Producto ECM comercializado		0,56%	0,02%	93,13%	1,97%
UECM (control)		2,16%	0,06%	84,06%	2,32%

Conclusiones:

En la muestra de ensayo de los andamios porcinos, el colágeno soluble era aproximadamente 1,6% a 2,7% del peso en seco total del tejido, y el colágeno insoluble varió de 70% a 85% del peso en seco total del tejido. El producto ECM comercializado tuvo una menor concentración de colágeno soluble y una concentración más alta de colágeno insoluble, comparado con las muestras del andamio porcino.

EJEMPLO 9

Inmunomarcaje para Colágeno IV y Laminina

Objetivo:

El objetivo de este estudio era evaluar la presencia de Colágeno IV y Laminina en: (i) andamios porcinos, cada uno fabricado de placenta de una de tres razas de cerdos (Raza 1, Raza 2, y Raza 3); y (ii) placentas crudas lavadas de estas tres razas. El ensayo se efectuó de conformidad con los requerimientos claves de los estándares regulatorios de Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP).

Métodos:

Se usaron métodos de inmunomarcaje para identificar la presencia de Colágeno IV y Laminina. Muestras del artículo de ensayo se hidrataron en agua tipo 1 durante 1 hora y luego se fijaron en formalina tamponada neutra al 10% (NBF - *neutral buffered formalin*) durante por lo menos 72 horas, se empotraron en parafina, se cortaron a un espesor de 5 micrones, y se montaron sobre portaobjetos de vidrio. Los anticuerpos usados para el inmunomarcaje de Colágeno IV y Laminina se resumen en Tabla XI.

Tabla XI

Moléculas	Anticuerpo Primario	Anticuerpo Secundario
Colágeno IV	Abcam ab6586 (policlonal de conejo)	Sigma A0545 (anti-IgG de conejo conjugado con HRP)
Laminina	Sigma L9393 ()	Sigma A0545 (anti-IgG de conejo conjugado con HRP)

Cuando cada sección de un artículo de ensayo se expuso a una solución de bloqueo (*a block solution*) que contenía el anticuerpo primario, una sección de control de tinción de

fondo en el mismo portaobjetos del microscopio se trató con la solución de bloqueo únicamente (“control de eliminación primario”). Todas las secciones se expusieron seguidamente al segundo anticuerpo diluido en la solución de bloqueo. Luego del inmunomarcaje, los portaobjetos se fotografiaron en el microscopio Zeiss Observer Z1 usando la cámara Axiocam MRc y el objetivo 20X.

Conclusiones:

La presencia de Colágeno IV (Col IV) y Laminina (Lam) en: (i) andamios porcinos fabricados de la placenta de una de tres razas de cerdos (Raza 1, Raza 2, y Raza 3); y (ii) placentas lavadas crudas de esas tres razas se evaluaron mediante inmunomarcaje. El estudio de inmunomarcaje evaluó la presencia de Col IV y Lam que fueron reconocidos por los anticuerpos primarios usados para el inmunomarcaje y no detectaron Col IV o Lam que habían sido cambiados durante el procesamiento de tal manera que los epítomos reconocidos por los anticuerpos ya no quedaron más tiempo intactos.

Los resultados del inmunomarcaje mostraron que Col IV estuvo presente en placentas porcinas crudas de todas las tres (Raza 1, Raza 2, y Raza 3) y se localizó en las áreas esperadas, específicamente, áreas ricas en membrana basal. Adicionalmente, Col IV estuvo presente en: el andamio porcino preparado de Raza 1; el andamio porcino preparado de Raza 2; y el andamio porcino preparado de Raza 3.

Los resultados del inmunomarcaje de Lam mostraron que Lam estuvo presente en placentas porcinas crudas de todas las tres razas (Raza 1, Raza 2, y Raza 3) y se localizó en las áreas esperadas, áreas ricas en membrana basal y vasos sanguíneos. Adicionalmente, Lam estuvo presente en: el andamio porcino preparado de Raza 1; el andamio porcino preparado de Raza 2; y el andamio porcino preparado de Raza 3.

EJEMPLO 10

Tratamiento de Dehiscencia de Herida de Incisión Postoperatoria

Un paciente masculino de 63 años presentó una dehiscencia de incisión quirúrgica postoperatoria aproximadamente tres semanas después de una amputación de Syme. Las comorbilidades incluían diabetes mellitus, enfermedad de arteria coronaria, y enfermedad renal de fase 3. El paciente presentaba una dehiscencia de herida quirúrgica postoperatoria con una longitud de 4 cm y una altura de 1,5 cm (véase FIG. 1). El tratamiento inicial de la dehiscencia de la herida involucró el tratamiento de cuidado estándar, incluyendo un desbridamiento a

fondo para limpiar los márgenes y Betadine húmeda a cambios de vendajes secos. Dos semanas de tratamientos sucesivos no solucionaron la herida.

Después de las dos semanas de tratamiento de cuidado estándar, la herida se sometió a desbridamiento y limpieza dejando una herida de 4 cm de longitud y 1 cm de altura (véase FIG. 2). La herida se recubrió con un andamio porcino preparado de acuerdo con los métodos provistos aquí. Un apósito secundario no adherente y gasa se pusieron sobre el andamio porcino. El paciente fue sometido a cuatro semanas sucesivas más de tratamiento, cada una involucrando el desbridamiento de la herida, la aplicación del andamio porcino, y la colocación de un apósito secundario no adherente y gasa (véase FIGS. 3-7). La herida exhibió una progresión de la curación durante las cinco semanas de las aplicaciones de andamios porcinos. Una semana luego de la quinta aplicación del andamio porcino, la herida exhibió re-epitelización y se consideró curada (véase FIG. 8). En la cita de seguimiento en la semana cuatro, la herida permanecía cerrada y curada (véase FIG. 9).

EJEMPLO 11

Tratamiento de Dehiscencia de Herida de Incisión Postoperatoria

Un paciente femenino de 77 años de edad presentó una dehiscencia de incisión quirúrgica postoperatoria aproximadamente dos semanas después de la excisión de un hueso del tarso. La comorbilidades incluían diabetes mellitus, neuropatía diabética, y artropatía de Charcot. La paciente presentaba una dehiscencia de herida quirúrgica postoperatoria con una longitud de 1 cm y una altura de 0,2 cm (véase FIG. 10). El tratamiento inicial de la dehiscencia de herida involucró el tratamiento de cuidado estándar, incluyendo desinfección y un desbridamiento a fondo para limpiar los márgenes. Cuatro semanas de tratamientos sucesivos no solucionaron la herida. Luego de las cuatro semanas de tratamientos de cuidado estándar, la herida se sometió a un desbridamiento a fondo y limpieza, dejando una herida de 1 cm de longitud y 0,2 cm de altura (véase FIG. 11). La herida se recubrió con un andamio porcino preparado de acuerdo con los métodos provistos aquí. A continuación, se aplicó un apósito secundario no adherente y gasa sobre el andamio porcino. A la paciente se le puso una bota para caminar y se le permitió soportar peso. En la cita de seguimiento a una semana, la herida había cerrado (véase FIG. 12) y la paciente hizo la transición a un zapato para diabéticos con plantillas ortopédicas. En la cita de seguimiento de seis semanas, la herida permaneció cerrada y curada (véase FIG. 13).