

FIG. 6A-C muestra una imagen del injerto vascular regenerativo basado en vasos sanguíneos de mamífero (6A). Microscopía electrónica de barrido (SEM) de superficie interna funcionalizada (6B). Histología de sección transversal de del injerto vascular regenerativo basado en vasos sanguíneos de mamífero (6C).

FIG. 7A-D muestra una imagen del injerto vascular regenerativo elaborado por electrohilado de polímeros. Vista lateral (7A) y transversal de injerto multicapa (7B). Sección transversal injerto multicapa en SEM (7C) e histología del injerto multicapa en sección transversal (7D).

FIG. 8A-B muestra unas gráficas de Curvas de estrés – deformación circunferencial para el injerto multicapa comparado con arteria nativa porcina (PCA).

FIG. 9A-C muestra un SEM de superficie arteria decelularizada (9A); SEM de superficie injerto basado en vasos sanguíneos funcionalizado con recubrimiento PEG y péptidos (9B); SEM sección transversal de injerto basado en electrohilado (9C).

FIG. 10A-C muestra una histología de los injertos vasculares basados en vasos sanguíneos (10A) y basados en electrohilado (10B).

FIG. 11A-B muestra una caracterización del diámetro del poro de los injertos vasculares basados en vasos sanguíneos (11A) y basados en electrohilado (11B).

FIG. 12 muestra una prueba de hemólisis en donde se verifica que el injerto vascular regenerativo es hemocompatible y en donde las siglas significan: PRP: Plasma rico en plaquetas, Eph. Epinefrina, PTFE: Injerto comercialmente disponible en PTFE, DF: Arteria porcina decelularizada funcionalizada (TEVG Biológico 100A), D: Arteria porcina decelularizada, P: PEUU y Gelatina, PF: PEEUU y Gelatina Funcionalizado.

FIG. 13 muestra una prueba de LDH (enzima lactate dehydrogenase) como indicador de activación plaquetaria en la superficie del injerto, mostrando que las funcionalizaciones reducen la probabilidad de formación de trombos. PRP: Plasma rico en plaquetas, Eph. Epinefrina, PTFE: Injerto comercialmente disponible en PTFE, DF: Arteria porcina decelularizada funcionalizada, D: Arteria porcina decelularizada, P: PEUU y Gelatina, PF: PEEUU y Gelatina Funcionalizado.

FIG. 14A-B muestra unas gráficas de los indicadores de crecimiento de células proendoteliales (HUVECs) en biomateriales, en la que se compara la efectividad de proliferación celular al incluir diferentes mezclas de péptidos proendoteliales al tratamiento superficial. Densidad celular a las 24h de siembra de HUVECs sobre la superficie de arteria funcionalizada CA: Arteria carótida decelularizada; A, B, C, D: mezclas de péptidos adhesivos (MEZCLA A: RGD; B:RGD y YIGSR; C:RGD y IKVAV; D: RGD y SKVVLGR) (14A). Porcentaje de viabilidad obtenido tras 24 de exposición directa a injertos de PEUU: Gelatina. MC: Multicapa (funcionalizado con péptidos proendoteliales), PEUU: polímero base, PET: Injerto comercial de dacron. PTFE: Injerto comercial de teflón (14B).

FIG. 15 muestra una expresión de genes de función endotelial, mostrando modulación de la expresión genética que previene agregación plaquetaria y promueve maduración endotelial para los injertos funcionalizados con péptidos proendoteliales A, B, C, D: mezclas de péptidos adhesivos (MEZCLA A: RGD; B:RGD y YIGSR; C:RGD y IKVAV; D: RGD y SKVVLGR).

FIG. 16 muestra imágenes de una cirugía para la evaluación in vivo de los injertos vasculares. Animal en preparación para cirugía de implantación de injerto en aorta abdominal (16A); injerto anastomosado a aorta abdominal con flujo (16B), injerto permeable (sin trombo) tras necropsia (16C).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención corresponde a un injerto vascular regenerativo que comprende una matriz porosa multicapa cilíndrica basada en colágeno con un recubrimiento funcional con péptidos proendoteliales y un polímero hidrofílico, el cual promueve la recuperación y la función fisiológica de vasos sanguíneos nativos dañados mediante la regeneración del tejido vascular.

Asimismo la presente invención se refiere a un método para elaborar el injerto vascular regenerativo.

Para propósitos de interpretar esta descripción, se debe tener en cuenta el significado usual en el campo técnico de los términos acá incorporados, a menos que se incorpore una definición particular o el contexto indique claramente lo contrario. De manera particular, se aplicarán las siguientes definiciones y cuando sea apropiado, los términos utilizados en forma singular también incluirán la forma plural.

Injerto: construcción o estructura formada por un material vivo o no, biológico o sintético, que proporciona un soporte físico que reemplaza a un tejido lesionado, que debería ser similar a la estructura del tejido reemplazado. En la presente invención, los injertos son injertos vasculares, es decir injertos que reemplazan un vaso lesionado y promueven su regeneración.

En estos ensayos una probeta del injerto vascular se acopla en un sistema que mide la fuerza requerida para generar una deformación a una tasa fija y así medir la elasticidad de la probeta. Esta prueba se realizó en los injertos vasculares diseñados y en las arterias nativas, y los resultados se ilustran en la Figura 1. Estos resultados evidencian que en dirección circunferencial, los injertos a base de vasos decelularizados y a base de fibras poliméricas electrohiladas mantienen elasticidad comparable con la arteria nativa para las deformaciones que ocurren en el espectro fisiológico. Las pruebas de esfuerzo circunferencial del injerto vascular regenerativo basado en vaso decelularizado evidencian que el proceso de decelularización no afecta las propiedades mecánicas del vaso. Por otro lado, se evidencia que el entrecruzamiento representa un refuerzo estructural al injerto.

Los resultados de las pruebas de esfuerzo circunferencial después de punzonamiento del injerto vascular regenerativo basado en vaso decelularizado demostraron que el punzonamiento no genera alteración estructural manteniendo los rangos de operación mecánica del injerto previo punzonamiento. Las Figuras 8A y 8B muestran los resultados de las pruebas de esfuerzo circunferencial del injerto vascular regenerativo basado en polímeros electrohilados en las que se demuestra que a pesar de que cada capa de manera independiente tiene propiedades elásticas diferentes al vaso nativo (8A), una vez se genera el injerto multicapa, los rangos de operación de dicho injerto son comparables con la arteria nativa (8B).

Ejemplo 3. Caracterización microscópica

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se utilizó microscopía electrónica de barrido (SEM) para observar la morfología de la superficie interior y exterior de los injertos. Las Figuras 9A y 9B muestran las microscopías (SEM) de la superficie de la arteria decelularizada, la superficie del injerto basado en vaso sanguíneo funcionalizado con recubrimiento PEG y péptidos. La Figura 9C muestra la cara

externa y lumen interno de un injerto a base de polímeros electrohilados. Para obtener estas imágenes los injertos fueron llevados a punto crítico de deshidratación y recubiertos con oro. En estas figuras se observa como con el recubrimiento con polímeros y péptidos se cubre la estructura colagenosa de la arteria nativa (9B y 9A) y cómo para el injerto multicapa electrohilada, la porosidad resultante del entrecruzamiento de fibras es gradualmente creciente desde la íntima hacia el exterior del injerto (9C)

Verificación estructural de los injertos por histología

Con respecto a los injertos vasculares basados en arterias porcinas, posterior al proceso de decelularización de las arterias porcinas se realizó una verificación de la cantidad de células remanentes en la matriz extracelular que será utilizada como injerto vascular regenerativo. Dicha verificación se desarrolló posterior a la tinción de cortes histológicos de las muestras con hematoxilina/eosina por medio de un conteo de células que pueden evidenciarse en tonalidades purpura dentro de la matriz teñida de rosa (Figura 10A). Además de esto, esta figura demuestra que el proceso de decelularización no afecta la estructura concéntrica característica de la arteria nativa.

Con respecto a los injertos vasculares basados en polímero y gelatina, se realizó una tinción tricrómica de Masson para confirmar la presencia de colágeno en la estructura del injerto. Es posible observar en la imagen, cómo las distintas capas del injerto poseen una concentración específica de gelatina (Figura 10B).

Caracterización de la porosidad: diámetro del poro

Se caracterizó el tamaño de poro de cada capa en los injertos vasculares basados en vasos sanguíneos como de los injertos basados en electrohilado de polímeros. Los resultados de dicha caracterización se ilustran en las Figuras 11A y 11B. Particularmente, en ambos tipos de injertos se observa el gradiente de porosidad, en donde el tamaño de poro es menor en las capas más internas y aumenta hacia las capas externas. Esta caracterización se hizo a partir

del análisis de imagen de las histologías hechas a cada uno de los injertos utilizando el software Image J y los filtros de medición de área.

Ejemplo 4. Pruebas de hemocompatibilidad

Hemólisis

Se tomaron muestras de sangre humana de voluntarios y se separaron los eritrocitos a partir de procesos de centrifugación y lavado. Posteriormente, se pusieron en contacto los eritrocitos con muestras de injertos durante 1 hora y se incubó a 37°C en una placa de cultivo de 96 pozos, y se centrifugó para separar los eritrocitos completos del líquido compuesto por agua y células lisadas. Se retiró el sobrenadante y se midió la absorbancia de las muestras para establecer la cantidad de hemoglobina liberada por los eritrocitos lisados debido al contacto con el injerto.

Como control positivo se utilizó tritón y como control negativo solución salina. Para todos los casos se obtuvieron porcentajes de hemólisis por debajo de 5% como se muestra en la Figura 12. Esto indica que ninguna de las variaciones del injerto genera lisis de las células sanguíneas, verificando que no el contacto con el material que lo compone no es tóxico para la sangre.

Actividad plaquetaria

Para evaluar la actividad plaquetaria al contacto con el injerto, se puso el injerto en contacto con una suspensión de plaquetas y posteriormente, se evaluó su actividad a través de la medición del número de plaquetas adheridas a la superficie.

Se obtuvo plasma rico en plaquetas (PRP) a partir de muestras de sangre de individuos sanos. A continuación este PRP se puso en contacto con los injertos basados en vasos sanguíneos funcionalizados (DF), arterias decelularizadas (D), PEUU:Gelatina (P) y PEUU:Gelatina

Funcionalizado (PF) y un control positivo de que consiste en un injerto convencional de PTFE bañado en epinefrina (PTFE Eph). El contacto se mantuvo durante 1h y se realizó un lavado de las muestras con PBS para retirar las plaquetas en suspensión no adheridas.

Las plaquetas adheridas se lisaron usando Triton 100X y se midió su actividad metabólica a través de LDH.

Como se ilustra en la Figura 13, el injerto vascular de vaso funcionalizado (DF) redujo la cantidad de plaquetas adheridas con respecto a la arteria decelularizada (D). Asimismo, los injertos multicapa (P) y multicapa funcionalizados (PF) muestran un porcentaje bajo de agregación plaquetaria.

Ejemplo 5. Pruebas de citocompatibilidad

El éxito del injerto vascular regenerativo depende de su potencial para sostener la reendotelialización, es decir la adhesión y proliferación de células proendoteliales en el lumen del vaso. Para esto se ejecutaron pruebas de adhesión, proliferación y actividad de células progenitoras endoteliales HUVECs sobre los injertos vasculares.

Prueba de citotoxicidad directa

En la prueba de citotoxicidad directa se sembró un número conocido de células sobre la superficie de los materiales a estudiar y se evaluó su condición final después de haber estado 254h expuestas al contacto con el material. Según los resultados de la Figura 14A, la arteria funcionalizada con el polímero y los péptidos seleccionados (CA+PEG+D) La mezcla D, corresponde a la mezcla de polímeros RGD y SKVVLGR. Esta demostró sostener con mayor efectividad el número de células vitales en la superficie. Por su parte el injerto de PEUU:Gel (MC) mostró mantener la viabilidad estable similar al polímero solo y a los controles comerciales de PET y PTFE (Figura 14B)

Maduración de células proendoteliales

Pasados 15 días de cultivo celular sobre las arterias decelularizadas y funcionalizadas, se realizó extracción de ARN. Posteriormente, se comprobó la integridad del ARN y se realizó la amplificación de genes relativos a la actividad de células endoteliales con relación a un gen constituyente como referencia de la cantidad de material genético presente en la muestra por medio de PCR en tiempo real.

En todos los casos, las arterias tratadas con péptidos evidenciaron presencia de los genes estudiados con resultados cercanos a los del control (arteria sin funcionalizar). Sin embargo, en el caso de CD44 y NOS3, se obtuvieron resultados superiores comparados con el control (Figura 15).

Ejemplo 6. Evaluación in vivo de los injertos vasculares

Para evaluar la viabilidad clínica del injerto se ejecutó un estudio piloto en donde se implantaron injertos vasculares regenerativos en 8 conejos.

Particularmente una porción de la arteria aorta abdominal por debajo de las derivaciones renales fue aislada, reseccionada, y reemplazada por un injerto vascular implantado a través de anastomosis termino terminal. Estas cirugías fueron ejecutadas por cirujanos cardiovasculares de la Fundación Cardioinfantil, en las instalaciones del bioterio de la Universidad Javeriana, bajo aprobación de su comité de ética de uso de modelos animales, y en condiciones asépticas, bajo anestesia y garantía de confort equivalente a las condiciones quirúrgicas para humanos.

El injerto demostró ser implantable y mantenerse permeable durante los tiempos perioperatorios.

Tras la aplicación de eutanasia en los animales, se encontró que el injerto se mantenía permeable y no mostraba señales de daños por contacto con el ambiente biológico. Las fotografías 16A a la 16C muestran el caso de un sujeto que fue intervenido y describen las etapas de alistamiento preoperatorio (A), el injerto anastomosado al lugar del implante (B) y post necropsia (C).

Se debe entender que la presente invención no está limitada a las modalidades descritas e ilustradas, pues como será evidente para una persona versada en el arte, existen variaciones y modificaciones posibles que no se apartan del espíritu de la invención, definido por las siguientes reivindicaciones.