



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 354 220**

⑤1 Int. Cl.:  
**A61L 27/38** (2006.01)  
**A61K 35/37** (2006.01)

①2

# TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **05786212 .0**  
⑨6 Fecha de presentación : **01.07.2005**  
⑨7 Número de publicación de la solicitud: **1773420**  
⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **18.04.2007**

⑤4 Título: **Utilización de fibroblastos gingivales en la terapia celular vascular.**

③0 Prioridad: **02.07.2004 FR 04 07357**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**11.03.2011**

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**11.03.2011**

⑦3 Titular/es: **Université Paris Descartes**  
**12, rue de l'École de Medecine**  
**75270 Paris Cédex 06, FR**  
**Assistance Publique - Hôpitaux de Paris**

⑦2 Inventor/es: **Gogly, Bruno y**  
**Lafont, Antoine**

⑦4 Agente: **Aznárez Urbieto, Pablo**

**Aviso:** En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

## UTILIZACIÓN DE FIBROBLASTOS GINGIVALES EN LA TERAPIA CELULAR VASCULAR

La presente invención se refiere a la utilización de fibroblastos gingivales en la terapia vascular celular, especialmente para el tratamiento de patologías arteriales.

5 La pared arterial se compone de tres capas superpuestas denominadas tunicas. La túnica interna (íntima) está constituida de una capa de células endoteliales. La túnica intermedia (media) se compone principalmente de fibras musculares lisas y de tejido conjuntivo rico en fibras elásticas. La túnica externa (adventicia) es una envoltura conjuntiva que rodea el conjunto.

10 Las arterias están sometidas a muchas agresiones de diverso origen (hipoxia, sobrecarga lipídica, fuerzas hemodinámicas, ateroma, hipertensión, etc.) que pueden inducir lesiones de la pared arterial. Durante la reparación de estas lesiones, se puede producir una reacción de cicatrización anormal, que resulta de un desequilibrio entre la degradación y la síntesis de la matriz extracelular, induciendo una remodelación arterial patológica que puede traducirse en un ensanchamiento vascular (aneurisma) o, por el contrario, por una constricción (estenosis, que surge secundariamente durante la aterogénesis, o

15 restenosis, consecuencia particular de una angioplastia que evoluciona con la remisión de la remodelación cicatrizal hacia la reaparición de una estenosis).

Por ejemplo, en las lesiones aneurismales se observa, en general, una degradación enzimática de los componentes de la matriz extracelular, especialmente de las fibras elásticas, así como una disminución del número de células musculares lisas (CML); en la adventicia se observa una fibrosis acompañada de

20 una importante infiltración inflamatoria.

La degradación de los componentes de la matriz extracelular implica a diversas proteasas matriciales. Entre ellas, se mencionará en particular una elastasa, la metaloproteinasa-9 matricial (MMP9), sintetizada por los leucocitos infiltrados y las células huésped fisiológicas (células endoteliales, células musculares lisas y fibroblastos adventiciales) que es responsable en su mayor parte de la fragmentación de las fibras elásticas (THOMPSON, J. Clin. Invest. 96: 318-326, 1995). Paralelamente, la disminución de las CML en la media ocasiona una disminución de la síntesis de los componentes de la matriz extracelular y de la de los inhibidores de las proteasas matriciales, que son sintetizadas principalmente por estas CML (LOPEZ-CANDALES y col., Am. J. Pathol. 150: 993-1007, 1997).

25

En el caso de la estenosis y de la restenosis se produce una remodelación fibrosa retráctil que puede ser considerada también como un proceso de cicatrización anormal. Esta remodelación se caracteriza por una hiperplasia fibrosa de la íntima (LAFONT y col., Circ. Res. 76 (6): 996-1002, 1995) y parece unida a un incremento del colágeno en la neoíntima, en la media y en la adventicia (LAFONT y col., Circulation 100(10): 1109-1115, 1999; DURAND y col., Arch. Mal. Coeur Vaiss. 94(6): 605-611, 2001).

30

Actualmente, el tratamiento de las patologías arteriales se basa principalmente en la cirugía y en la cardiología intervencional (cirugía vascular, puentes aortocoronarios y periféricos, prótesis aórticas de Dacron, angioplastia arterial coronaria y periférica, endoprótesis aórticas, etc.). Sin embargo, estas técnicas invasivas no tratan la causa, sino las consecuencias de la patología. Permiten una mejora de la situación del paciente sin ser capaces de detener el desarrollo de la enfermedad.

35

Por tanto, parece necesario disponer de nuevos medios de tratamiento menos invasivos que permitan tratar eficazmente la remodelación arterial patológica.

40

ALLAIRE y col., (J. Clin. Invest. 102(7): 1413-1420, 1998) observaron, en un modelo de aneurisma experimental en la rata, que la implantación local de CMS en la pared arterial inducía una inhibición de la degradación de las fibras elásticas y de la formación de un aneurisma. Se ha mostrado también en la rata que aneurismas experimentales ya formados pueden ser estabilizados por inyección local de CML. Esta estabilización se asocia a una secreción de TGF $\beta$  de origen paracrina a nivel de trasplante celular (LOS Y col., J. Vasc. Surg. 37(6): 1301-1309, 2003).

45

Sin embargo, un obstáculo más importante que la utilización de CMS para el tratamiento de los aneurismas mediante de la terapia celular se deriva de la necesidad de obtener estas CML a partir de células cepa. Las células cepa utilizadas proceden de la médula o de la sangre y resulta muy difícil obtenerlas.

50

Los inventores se han propuesto investigar si podían utilizarse eventualmente en terapia celular tipos de células distintas de las CML de la pared arterial y tuvieron la idea de someter a prueba los fibroblastos gingivales.

Los fibroblastos gingivales son células mesenquimatosas capaces de migrar, adherirse y proliferar dentro de los tejidos conjuntivos blandos de la encía, manteniendo así la integridad del tejido gingival

55

sometido a numerosas agresiones tales como fuerzas mecánicas, infecciones bacterianas, variaciones de pH, de temperatura, etc. (GOGLY y col., Clin. Oral Invest. 1:1 147-152, 1997; GOBLY y col., Biochem. Pharmacol. 56(11): 1447-1454, 1998; EJEIL y col., J. Periodontol. 74(2): 188-195, 2003).

- 5 Según las condiciones ambientales a las que están sometidos, los fibroblastos gingivales son capaces de cambiar de fenotipo y responder a los estímulos que proceden del entorno tisular gingival mediante proliferación, migración, síntesis o degradación de los componentes de la matriz extracelular.

- 10 Así, son capaces de sintetizar diversos componentes de la matriz extracelular: colágenos (tipos I, III, V, VI, VII, XII), fibras elásticas, proteoglicanos y glicosaminoglicanos, glicoproteínas. Asimismo, pueden producir una variedad de enzimas (en particular metaloproteasas), capaces de degradar estos compuestos macromoleculares. Por último, pueden expresar también inhibidores tisulares de las metaloproteasas que inhiben las formas activas de las MMP.

- 15 Los inventores realizaron co-cultivos de fibroblastos gingivales y de CML y observaron que las interacciones entre estas células conducían a la inhibición por los fibroblastos gingivales de la actividad de las MMP9 por las CML, así como a la potencialización de la secreción de TGF $\beta$  por ambos tipos celulares. Estos efectos son específicos de los fibroblastos gingivales y no se observan cuando las CML se co-cultivan con fibroblastos dérmicos o adventiciales.

Se realizaron observaciones idénticas en co-cultivos de fibroblastos gingivales y de arterias lesionadas. Este modelo organotípico ha permitido también demostrar que la presencia de fibroblastos gingivales induce una protección de la red elástica.

- 20 Se evidencia por tanto que los fibroblastos gingivales por una parte tienen un efecto inhibitor sobre uno de los factores principales de la formación de los aneurismas, a saber la MMP9 responsable de la degradación de la red elástica, y, por otra parte, un efecto activador sobre un factor favorable a la estabilización de los aneurismas, a saber la secreción de TGF $\beta$ .

- 25 Además, los inventores realizaron en conejos ensayos *in vivo* de trasplante de fibroblastos gingivales obtenidos a partir de una muestra de tejido gingival de conejo en la pared arterial de dicho conejo y constataron que estos fibroblastos gingivales autólogos eran capaces de insertarse en la pared a la altura de la media.

Por tanto, la presente invención tiene por objeto la utilización de fibroblastos gingivales para la obtención de una composición celular destinada al tratamiento de una patología de remodelación arterial.

- 30 Los fibroblastos gingivales se pueden utilizar, según la invención, en todas las patologías vasculares, especialmente arteriales, con alteraciones profundas de la matriz extracelular. Se mencionarán en particular: aterosclerosis, placa vulnerable, restenosis, aneurismas arteriales, disección aórtica.

Según una realización preferente de la presente invención, dicha patología es un aneurisma.

- 35 Según otra realización preferente de la presente invención, dicha patología es una estenosis o una restenosis tras una angioplastia.

Dichos fibroblastos son preferentemente fibroblastos autólogos, es decir fibroblastos procedentes de tejido gingival previamente extraído del sujeto al que se destina el tratamiento y cultivados. Preferentemente, estos fibroblastos se cultivan durante 14 días como mínimo y ventajosamente durante 14 a 70 días.

- 40 Los cultivos de fibroblastos gingivales a utilizar en la realización de la presente invención se pueden obtener por técnicas convencionales que son bien conocidas por el especialista en la técnica (BARLOVATZ-MEIMON y col., "Culture de cellules animales" p. 898, ill. Paris: INSERM, 2003).

- 45 La implantación de fibroblastos en la pared arterial puede llevarse a cabo de distintas maneras; bien sea localmente mediante inyección por medio de catéteres de balón provistos de microagujas (INFILTRATOR), inyección por vía externa o interna en la adventicia o el tejido periadventicial, o por vía general (venosa periférica o arterial aguas arriba del lugar de inyección con direccionamiento realizado por un guiado magnético (incorporación intracelular previa de nanopartículas superparamagnéticas) o biológica (WILHEM y col., Eur. Biophys. J. 31(2): 118-125, 2002; PANYAM y col., J. Drug Target 10(6): 515-523, 2002).

- 50 Si se desea, se puede asociar también a los fibroblastos gingivales, productos que intervienen en la remodelación matricial, por ejemplo, decorina (proteoglicano que interviene en la remodelación matricial) (AL HAJ ZEN y col., Matrix Biol. 22(3): 251-258, 2003) o ácido hialurónico.

La presente invención se entenderá mejor por medio del complemento de descripción siguiente, la cual se refiere a ejemplos no limitativos que ilustran los efectos de los fibroblastos gingivales a utilizar en terapia celular vascular.

#### 5 **Ejemplo 1: Secreción de MMP2, MMP9, TIMP-1 y TGF $\beta$ en co-cultivos de fibroblastos gingivales y de células musculares lisas**

##### **Marcado de los fibroblastos**

Los fibroblastos gingivales son marcados con nanopartículas aniónicas de maghemita tal como se describe en WILHEM y col., Biomaterials 24: 1001-1011, 2003.

10 Los fibroblastos gingivales (seis cultivos diferentes) se cultivan hasta confluencia en suero de ternera fetal (STF) al 10%; tras 48 horas, se extrae el sobrenadante de cultivo y se cultivan las células en un medio sin suero.

La calidad del marcado de los fibroblastos gingivales por estas nanopartículas se controla mediante tinción de Perl (azul de Prusia). Las nanopartículas se absorben e internalizan en el endosoma de los fibroblastos gingivales tal como se muestra en la Figura 1.

15 Para comprobar que el marcado no modifica el fenotipo de los fibroblastos gingivales, el efecto de la incorporación de las nanopartículas sobre la secreción de la metaloproteinasa-2 matricial (MMP2) así como de las citoquinas IL-1 $\beta$  y TGF $\beta$  se evalúa al D1, D3 y D5 (días de cultivo).

20 Al D1 se observa en los fibroblastos marcados un aumento de la producción de MMP2 y de IL-1 $\beta$ , que vuelven al nivel normal el D3 y D5. Este aumento transitorio se debe probablemente al estrés consecutivo a la incorporación de nanopartículas. En cambio, no se observa modificación alguna de la producción de TGF $\beta$  durante el período estudiado.

##### **Co-cultivos de fibroblastos gingivales y de células musculares lisas**

Se realizan co-cultivos de fibroblastos gingivales (FG) marcados y de células musculares lisas (CML) en geles de colágeno según el método descrito por GILLERY y col., Experientia 45(1): 98-101, 1989.

25 Brevemente, se obtienen las células a partir de muestras gingivales para los fibroblastos gingivales y a partir de la media arterial para las células musculares lisas. Las muestras (encía y media arterial) se colocan en primocultivo en cajas de Petri en medio de DMEM/STF al 20%. A confluencia, se tripsinizan las células y se vuelven a cultivar en un medio de DMEM/STF al 10%. Tras pasar varias veces en este medio, las células se cultivan en colágeno de tipo I (60.000 células en 2 ml de colágeno) durante 3, 7, 14 ó 21 días.  
30 Se cambian cada semana los medios de cultivo (DMEM/STF al 10%) en los que están inmersos los geles.

A modo de control, se realizan separadamente, en las mismas condiciones, cultivos de fibroblastos gingivales y cultivos de células musculares lisas.

##### **Secreción de MMP9 por las CML**

35 La secreción de MMP9 se localiza por inmunodetección el D3 y se observa por microscopia óptica (x 160).

No se detecta MMP9 en los fibroblastos: sólo se detecta en los lugares correspondientes a la localización de las CML en el gel. Estos resultados corroboran trabajos anteriores según los cuales los fibroblastos no expresan MMP9 (GOGLY y col., 1998, mencionado anteriormente).

#### 40 **Efectos de las interacciones FG/CML sobre la actividad de MMP2 y de MMP9 y sobre la transcripción de MMP9**

##### Evaluación de la actividad de MMP9 y de MMP2 por zimografía

45 20  $\mu$ l de muestra de cultivo de FG y/o de CML se diluyen 1/2 en Tris 1M pH 6,8 que contiene un 50% de glicerol y un 0,4% de azul de bromofenol, se somete a electroforesis en gel de poliacrilamida SDS al 10% que contiene 1 mg/ml de  $\alpha$ -caseína (Sigma Chemical) durante 1 hora. Se lavan los geles en Triton X-100 al 2,5% diluido en agua destilada, se incuban en 100 mM de Tris-HCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, Brij-35 al 0,005%, NaN<sub>3</sub> al 0,001% pH 7,4, durante 36 horas, a 37°C. Después se tiñen los geles con azul de Coomassie al 0,25% (Biorad, ref. G 250) (50% de metanol, 10% de ácido acético), luego se decoloran apropiadamente (40% de etanol, 10% de ácido acético). Se presentan los resultados en la Figura 2.

A: actividad MMP2 para 600 fibroblastos no marcados (control);

50 B: actividad MMP2 para 600 fibroblastos marcados cultivados en gel de colágeno;

C: actividades MMP2 y MMP9 para 600 CML cultivadas en gel de colágeno;

D: actividades MMP2 y MMP9 para 600 fibroblastos marcados cultivados + 600 CM cultivadas separadamente en gel de colágeno (se añaden los medios de los 2 cultivos separados, para determinar la actividad total en ausencia de interacciones entre los dos tipos celulares);

- 5 E: actividades MMP2 y MMP9 para 600 fibroblastos marcados y 60.000 CML co-cultivadas en gel de colágeno.

- 10 Los resultados muestran que los fibroblastos gingivales cultivados no expresan las MMP9 (A y B) a diferencia de las CML (C y D). En cambio, los fibroblastos inhiben la actividad de la MMP9 secretada por las CML co-cultivadas (E). Se observan los mismos resultados los D3 y D21. Con respecto a la MMP2, se observa una disminución de la actividad en los co-cultivos (E) con respecto a lo que se podría esperar teóricamente (D). Esta reducción sin embargo es menos significativa que la de la MMP9.

#### Evaluación de la transcripción de MMP9 por RT PCR

- 15 Los ARN totales (1 ó 2 µg) se extraen de los cultivos o de los co-cultivos de FG y de CML el D14 mediante el kit MMP-CytoXpress Multiplex PCR (BioSource International). Los ARNm obtenidos se retrotranscriben mediante una transcriptasa inversa, luego se realiza una PCR con cebadores específicos de MMP9 como sigue: una etapa de desnaturalización a 95°C durante 1 min., 5 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min. y de hibridación a 60°C durante 4 min., 35-40 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min. y de hibridación a 68°C durante 2,5 min., y una etapa final a 70°C durante 10 min., seguida de enfriamiento a 20°C. El GAPDH, que está transcrito de forma constitutiva, se utiliza a modo de control.
- 20 Los productos de PCR obtenidos se someten a electroforesis sobre un gel de agarosa al 2%. Se examina el gel bajo UV y se fotografía. Se presentan los resultados en la Figura 3.

M: marcador de peso molecular de ADN;

A: cultivo de FG no marcados (1 µg de ARN);

B: cultivo de FG marcados (1 µg de ARN);

- 25 C: cultivo de CML (1µg de ARN);

D: co-cultivo de CML y FG (1 µg de ARN);

E: co-cultivo de CML y FG (2 µg de ARN).

- 30 Los resultados no muestran modificación transcripcional alguna de la MMP9 en los cultivos de CML (C) y los co-cultivos de CML y FG (D y E), mientras se evidenció anteriormente por zimografía una reducción de la actividad de esta enzima en dichos co-cultivos. Por consiguiente, la acción de los fibroblastos gingivales se sitúa al nivel traduccional o post-traduccional.

#### **Efectos de las interacciones FG/CML sobre la producción de TIMP-1**

El inhibidor de la MMP9 (TIMP-1) es expresado por los fibroblastos gingivales e inhibe la forma activa de MMP9 formando un complejo MMP9/TIMP-1 inactivo.

- 35 Las interacciones celulares se estudian a través de la expresión de TIMP-1 los D3, D7, D14, D21 (días de cultivo).

#### Evaluación de la producción de TIMP-1 por dot-blot

- 40 Partes alícuotas (1 ml) de sobrenadante de co-cultivo de FG y CML en gel de colágeno se llevan hasta un volumen final de 100 µl en medio DMEM, se centrifugan a 10.000 g para eliminar los residuos celulares, se adicionan 10 µl de una solución Tris-HCl 1M, NaCl 150 mM, pH 7,5. A modo de control, sobrenadantes de FG solos o de CML solos se preparan en las mismas condiciones. Las muestras (5 µl) se depositan en tres ejemplares sobre una membrana de nitrocelulosa (Biorad, ref. 1 620 115). Se incuban las membranas con una solución de bloqueo al 1% (Boehringer, ref. 1 096 176) durante 1 hora, a temperatura ambiente, luego se enjuagan 4 x 15 min. en TBS-Tween (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,1%, pH 7,5).
- 45 Luego, se incuban las membranas con un anticuerpo primario policlonal de cabra anti-humano anti-TIMP-1 (1/500, R&D Systems, ref. AF970) durante toda la noche a temperatura ambiente. El anticuerpo primario es específico de las formas libres de TIMP-1. Después de lavados con TBS-Tween (4 x 15 min.), se incuban los blots con un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa (1/1000), durante 1 hora, se depositan en una solución de revelado que contiene peróxido de hidrógeno y diacilhidrazida (Luminol, Bohringer, ref. 1 500 694) durante 1 min., luego se pone en contacto con una película fotográfica Kodak BIO-MAX MR durante un período que oscila entre varios segundos y 10 minutos. Se revela y fija entonces
- 50

la película. Se examinan las múltiples exposiciones para confirmar la linealidad de los resultados. Se presentan los resultados en la Figura 4A.

Leyenda de la Figura 4A:

FG = cultivo de  $10^5$  FG no marcados;

5 FG\* = cultivo de  $10^5$  FG marcados;

CML = cultivo de  $10^5$ \* CML;

CML/FG\* = co-cultivo de  $10^5$  FG marcados y de  $10^5$  CML.

10 La imagen de la película se transmite a un ordenador que utiliza una cámara vídeo. El programa (Imagenia 3000, estación BIOCOM 200) evalúa por una parte la densidad de las manchas reveladas en las membranas y por otra su superficie de manera semiautomática por definición del contorno. Se presentan los resultados en la Figura 4B.

Leyenda de la Figura 4B:

Abscisa:

FG = cultivo de  $10^5$  FG no marcados

15 FG\* = cultivo de  $10^5$  FG marcados;

CML = cultivo de  $10^5$ \* CML;

CML/FG\* = co-cultivo de  $10^5$  FG marcados y de  $10^5$  CML.

Ordenada CML = secreción de TIMP-1 (pg/ml/ $10^5$  células)

\*\*\* = prueba de la T de Student Fischer,  $p < 0,001$

20 Los resultados muestran un fuerte aumento de la secreción de TIMP-1 en los co-cultivos de FG y CML en comparación con su secreción en los cultivos de FG solos o de CML solos. Se observan los mismos resultados los D3, D7, D14 y D21.

#### Evaluación de la transcripción de TIMP-1 por RT PCR

25 La extracción de los ARNm de TIMP-1 y la RT PCR se realizan tal como se ha descrito anteriormente para MMP9 con cebadores específicos de TIMP-1. Se presentan los resultados en la Figura 5.

M: marcador de peso molecular de ADN;

A: cultivo de FG no marcado (1 µg de ARN);

B: cultivo de FG marcado (1 µg de ARN);

30 C: cultivo de CML (1µg de ARN);

D: co-cultivo de CML y FG (1 µg de ARN);

E: co-cultivo de CML y FG (2 µg de ARN).

Los resultados muestran un incremento de la transcripción de TIMP-1 en los co-cultivos de CML y FG (Figura 5, D y E) que está en correlación con el aumento de la secreción de TIMP-1 (Figura 4).

35 Evaluación de la producción de complejos MMP9/TIMP-1 mediante el ensayo ELISA

Se estudian las interacciones celulares a través de la producción de los complejos MMP9/TIMP-1 los D3, D7, D14, D21 (días de cultivo) mediante el ensayo ELISA con un kit DuoSet® ELISA Development (R&D Systems, ref. DY 1449) siguiendo las instrucciones del fabricante (anticuerpo específico de los complejos MMP9/TIMP-1). Se presentan los resultados en la Figura 6.

40 Abscisa:

FG = cultivo de  $10^5$  FG no marcados

FG\* = cultivo de  $10^5$  FG marcados;

CML = cultivo de  $10^5$ \* CML;

CML/FG\* = co-cultivo de  $10^5$  FG marcados y de  $10^5$  CML.

Ordenada CML = secreción de MMP9/TIMP-1 (pg/ml/ $10^5$  células)

\*\* = prueba T de Student Fischer,  $p < 0,01$

5 \*\*\* = prueba T de Student Fischer,  $p < 0,001$

Los resultados muestran que la cantidad de complejos MMP9/TIMP-1 dosificada por ELISA se incrementa (x4) en los co-cultivos de CML y FG (CML/FG\*). Se obtienen los mismos resultados los D3, D7, D14 y D21.

10 Del conjunto de estos resultados se deduce que la disminución de la actividad de MMP9 por las CML co-cultivadas con los FG no resulta de una reducción de su síntesis, sino de un aumento de la síntesis de su inhibidor TIMP-1 y, por tanto, de los complejos MMP9/TIMP-1 inactivos.

#### **Efectos de los co-cultivos FB/CML sobre la secreción de TGFβ**

Se estudian las interacciones celulares a través de la expresión de la citoquina TGFβ los D3, D7, D14, D21/D28 (días de cultivo).

15 Evaluación de la producción de TGFβ mediante el ensayo ELISA

Se evalúa la producción de TGFβ mediante ensayo ELISA con un kit DuoSet® ELISA Development (R&D Systems, ref. DY240) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se presentan los resultados de la prueba ELISA los D3, D7, D14, D21 en la Figura 7.

Leyenda de la Figura 7:

20 Abscisa:

FG = cultivo de  $10^5$  FG no marcados

FG\* = cultivo de  $10^5$  FG marcados;

CML = cultivo de  $10^5$ \* CML;

CML/FG\* = co-cultivo de  $10^5$  FG marcados y de  $10^5$  CML.

25 Ordenada = secreción de TGFβ (pg/ml/ $10^5$  células)

\*\* = prueba T de Student Fischer,  $p < 0,01$

\*\*\* = prueba T de Student Fischer,  $p < 0,001$

#### Evaluación de la producción de TGFβ por dot-blot

30 Se evaluó la producción de TGFβ por dot-blot mediante un anticuerpo monoclonal de ratón anti-TGFβ1 (R&D Systems, ref. MAB 240) y utilizando el protocolo descrito más arriba en el caso de TIMP-1. Se representan en la Figura 8 los resultados por dot-blot los D3, D7, D14, D28.

Leyenda de la Figura 8:

FG = cultivo de  $10^5$  FG no marcados;

FG\* = cultivo de  $10^5$  FG marcados;

35 CML = cultivo de  $10^5$ \* CML;

CML/FG\* = co-cultivo de  $10^5$  FG marcados y de  $10^5$  CML.

Los resultados muestran la potencialización de la secreción de TGFβ por las células FG y CML co-cultivadas.

40 **Ejemplo 2: Comparación de los efectos de los fibroblastos gingivales con los efectos de los fibroblastos dérmicos o adventiciales sobre las actividades MMP2 o MMP9 de las CML**

Se realizan co-cultivos de fibroblastos dérmicos (FD) o adventiciales (FA) y de células musculares lisas (CML) en gel de colágeno con el mismo protocolo que descrito en el Ejemplo 1 anterior para los fibroblastos gingivales.

- 5 Se obtienen células a partir de muestras cutáneas para los fibroblastos dérmicos, muestras de la adventicia para los fibroblastos adventiciales y muestras de la media arterial para las células musculares lisas.

A modo de control se realizan separadamente, en las mismas condiciones, cultivos de fibroblastos dérmicos o adventiciales así como cultivos de células musculares lisas.

- 10 Se estudian las interacciones celulares los D7 y D14 mediante determinación por zimografía de las actividades MMP2 y MMP9 secretadas en el medio de cultivo, tal como se describe en el Ejemplo 1 anterior. En paralelo, se someten 20 µl de MMP9 recombinante (R&D Systems, ref. 911-MP) a la misma electroforesis para controlar el tipo de MMP analizado. Se presentan los resultados en la Figura 9.

A: 20 µl de control (100 µl) de MMP9 recombinante;

B: actividad de MMP2 para 600 FG cultivados en gel de colágeno;

- 15 C: actividad de MMP2 para 600 FD cultivados en gel de colágeno;

D: actividad de MMP2 para 600 FA cultivados en gel de colágeno;

E: actividades de MMP2 y MMP9 para 600 CML cultivadas en gel de colágeno;

F: actividades de MMP2 y MMP9 para 600 CML y 600 FG co-cultivados en gel de colágeno;

G: actividades de MMP2 y MMP9 para 600 CML y 600 FD co-cultivados en gel de colágeno;

- 20 H: actividades de MMP2 y MMP9 para 600 CML y 600 FA co-cultivados en gel de colágeno.

- 25 Los resultados muestran que, al igual que los fibroblastos gingivales (B) y a diferencia de las CML (E), los fibroblastos dérmicos y adventiciales cultivados no expresan la MMP9 (C y D). En cambio, los fibroblastos dérmicos y adventiciales no afectan a la actividad de la MMP9 secretada por las CML co-cultivadas (G y H), a diferencia de los fibroblastos gingivales que inhiben esta actividad (F). Se observan los mismos resultados los D7 y D14. Con relación a la MMP2, no se observa ninguna modificación significativa de la actividad de las formas libres de esta enzima. No parece que los fibroblastos gingivales, al igual que los fibroblastos dérmicos o adventiciales, modifiquen la secreción de la MMP2 co-cultivada con las CML.

### **Ejemplo 3: Cultivos organotípicos de arterias lesionadas**

- 30 El cultivo tridimensional de arterias lesionadas en gel de colágeno ha sido puesto a punto por los inventores con el fin de proporcionar un modelo que permita el análisis de la remodelación arterial con el tiempo.

#### **Obtención de los cultivos**

- 35 Se inducen lesiones de tipo aterosclerótico en 5 conejos blancos de Nueva-Zelanda mediante la combinación de una desecación del aire y una dieta con fuerte contenido en colesterol, tal como se describe en LAFONT y col. (Circ. Res. 76(6): 996-1002, 1995; Circulation 100 (10): 1109-1115, 1999). Después de 4 semanas, se confirma la presencia de lesiones ateroscleróticas por arteriografía dentro de las dos arterias femorales. Luego, se producen lesiones yatrógenas en las arterias femorales izquierdas con un catéter de balón para angioplastia (3 insuflaciones a 6 atm durante 60 s).

- 40 24 horas después de la angioplastia, se sacrifican los conejos mediante inyección intracardiaca de fenobarbital. Se recogen las arterias tras la disección y se almacenan en DMEM que contiene STF al 20% a 4°C durante 3-10 horas, antes del inicio de su cultivo. De esta forma, se recogen 5 arterias ateroscleróticas progresivas (AAP) y 5 arterias ateroscleróticas 24 horas después de la angioplastia (AAA).

- 45 Se enjuagan las arterias con una solución de Hanks, se disecan de modo tal que se preserve la adventicia y se eliminan los tejidos circundantes. Finalmente, se descompone cada arteria en 4 segmentos de 5-7 mm.

Se coloca cada segmento en un Erlenmeyer de 10 ml que contiene 6 ml de medio de cultivo (DMEM / STF al 20%, antibióticos y antifúngicos habituales), 3,4 ml de colágeno de rata de tipo I (Jacques Boy Institut, REIMS, Francia) y 600 µl NaOH 0,1N filtrado y homogeneizado con la solución. Finalmente, se

transfiere la totalidad a una caja de cultivo en una incubadora a 37°C / 5% de CO<sub>2</sub>. Cada semana, se añade 1 ml de medio de cultivo al sobrenadante para compensar la evaporación.

- 5 Los D3, D7, D14 o D28 (días de cultivo) se recuperan las arterias y sus redes de colágeno, se enjuagan con PBS 1X y se fijan en una solución de PBS / paraformaldehído al 4% durante 48 horas. Luego, se deshidratan en alcohol 70°, 95° y 100° y por último en tolueno antes de su inclusión en parafina. Se preparan los bloques de parafina con objeto del corte.

Los sobrenadantes de cultivo de las 5 series de arterias se almacenan a -80°C.

### **Evaluación morfológica de los cultivos**

- 10 Se realizan con microtomo cortes de 7 µm de espesor, se tiñen utilizando tres protocolos específicos diferentes:

Protocolo hemalum / eosina: tras la rehidratación, se recubren los cortes con hemalum durante 5 minutos antes de la diferenciación con agua de grifo, luego con eosina durante 1 minuto. Finalmente, se enjuagan las preparaciones microscópicas con agua destilada antes de la deshidratación y ensamblaje final.

- 15 Protocolo rojo sirio: tras la rehidratación, se recubren los cortes con rojo sirio durante 30 minutos. Finalmente, se enjuagan las preparaciones microscópicas con agua destilada antes de la deshidratación y ensamblaje final.

Protocolo catequina(+)-fucsina: tras la rehidratación parcial (interrumpida con alcohol 95°), se sumergen los cortes en una solución colorante, protegidos contra la luz, durante 2 horas 1/2. Se realiza un enjuague rápido con alcohol 95° (con 2 gotas de ácido clorhídrico) antes de la deshidratación y ensamblaje final.

- 20 Numeración celular

Los cortes teñidos con hemalum-eosina se observan bajo microscopio acoplado a un ordenador (BIOCOM 200 station). El recuento semiautomático de las células se hace posible punteando los núcleos. Los resultados se dan en número de células por unidad de superficie.

- 25 Dentro de las proliferaciones de la íntima (AAP) y de la neoíntima (AAA), el número de células por unidad de superficie disminuye significativamente con el tiempo. Esta reducción es muy significativa entre el D3 y el D7 ( $p<0,001$ ), significativa entre el D7 y el D14 ( $p<0,01$ ) y más bien significativa entre el D14 y el D28 ( $p<0,05$ ).

Dentro de la media, el número de células musculares lisas es relativamente estable, tanto en el caso de las AAP como de las AAA.

- 30 Dentro de la red de colágeno, el número de células por unidad de superficie aumenta. Este aumento es muy significativo entre el D3 y el D7 ( $p<0,001$ ), significativo entre el D7 y el D14 ( $p<0,01$ ). Este incremento ya no es significativo entre el D14 y el D28: parece que interviene un efecto umbral el D28.

### Morfología arterial

- 35 Con el mismo proceso de digitalización de la imagen, se realizan mediciones del espesor de la media así como mediciones del espesor de las proliferaciones de la íntima (AAP) y de la neoíntima (AAA). Las mediciones se toman 10-12 veces, en 6 zonas diferentes dentro de cada arteria cultivada.

Estas mediciones no muestran modificaciones significativas con el tiempo.

### **Cuantificación de los componentes de la matriz extracelular**

#### Componentes de la red de colágeno

- 40 Tras la digitalización de la imagen, el programa puede evaluar la superficie relativa del componente de colágeno (en cortes teñidos con rojo sirio, observados con luz polarizada para evidenciar los colágenos fibrilares).

- 45 Los componentes de la red de colágeno se evalúan en las proliferaciones de la íntima (AAP) y de la neoíntima (AAA). En ambos casos, se observa con el tiempo un incremento de la densidad de la red de colágeno. Además, realizándose las mediciones en cortes observados con luz polarizada, el aumento observado se refiere al compuesto fibrilar de la red de colágeno.

#### Componentes de la red elástica

Tras la digitalización de la imagen, el programa puede evaluar la superficie relativa de las redes elásticas (en cortes teñidos con catequina(+)-fucsina).

- Con el tiempo, la superficie relativa de los componentes de la red elástica en la media presenta una reducción. En el caso de las AAP, la reducción es significativa entre el D3 y el D14 ( $p < 0,01$ ) y muy significativa entre el D14 y el D28. En el caso de las AAA, esta reducción sólo es significativa entre el D14 y el D28 ( $p < 0,06$ ). Sin embargo, las AAP tienen inicialmente (el D3) un componente elástico más significativo que las AAA. Pero el D28, los componentes de la red elástica son prácticamente equivalentes entre estas dos series de arterias.

Por último, en las proliferaciones de la íntima y de la neoíntima se observa con el tiempo un aumento de los componentes de la red elástica. Este incremento es muy significativo entre el D7 y el D28 para las AAP y entre el D14 y el D28 para las AAA ( $p < 0,001$ ).

#### 10 Fragmentación de las fibras elásticas

Los cortes teñidos con hemalum-eosina se observan por microscopía electrónica bajo UV. Tras la fotografía de los cortes y el estudio informático de las fotos, se mide la longitud de las fibras elásticas entre dos puntos de fragmentación. Esta longitud refleja el estado de fragmentación: cuanto más corta es la longitud de las fibras, más significativa es la fragmentación.

- 15 Dentro de las AAP, las láminas elásticas están bien organizadas, paralelas entre sí y concéntricas al D3. La fragmentación de las fibras es entonces muy moderada. Sin embargo, la longitud de las fibras elásticas disminuye con el tiempo. Esta reducción es muy significativa entre el D3 y el D7 y el D14 y el D28 ( $p < 0,001$ ). Ello refleja la fragmentación progresiva de las fibras elásticas, que aparecen desorganizadas y fragmentadas al D28.
- 20 Dentro de las AAA, las láminas elásticas están desorganizadas y fragmentadas desde los primeros días de cultivo. El D3 esta fragmentación es similar a lo que se observa para las AAP al D28. Sin embargo, este fenómeno de fragmentación sigue desarrollándose con el tiempo y de forma tan significativa como en los casos de las AAP. En este modelo, el resultado de la microscopía UV muestra que la longitud de las fibras elásticas en las arterias lesionadas disminuye de 466  $\mu\text{m}$  al D3 a 87  $\mu\text{m}$  al D28.
- 25 El conjunto de análisis morfométricos muestra que la coherencia tisular arterial en cultivo se mantiene hasta el final del período de experimentación. Además, los fenómenos dinámicos de remodelación celular y matricial observados *in vitro* corresponden a los datos establecidos *in vivo*, tanto en las situaciones inflamatorias violentas (AAA) como lentas (AAP). Por tanto, en principio los cultivos organotípicos de arterias lesionadas en gel de colágeno constituyen un modelo de aneurisma *ex-vivo* válido.

#### **Ejemplo 4: Evaluación de la secreción de enzimas clave de la remodelación arterial por los cultivos organotípicos de arterias lesionadas**

##### **Secreción de MMP-1, -2 y -3, TIMP-1 y -2**

- 35 La expresión de MMP1, MMP2, MMP3, TIMP-1 y TIMP-2 secretadas en el medio de cultivo organotípico de arterias AAA y AAP se analiza mediante dot-blot tal como se describe en el Ejemplo 1 anterior mediante anticuerpos humanos dirigidos contra estas MMP y TIMP (Valbiotech). A modo de control, se investiga también la presencia de estas MMP y TIMP en el suero de cultivo (STF). Se presentan en la Figura 10 los resultados.

A: expresión de MMP1

- 40 B: expresión de MMP3

C: expresión de MMP2

D: expresión de TIMP-1

E: expresión de TIMP-2

Entre el D3 y el D28, los resultados muestran:

- 45 – un incremento significativo de la expresión de MMP-1 (A) y MMP-3 (B), con una concentración significativamente más importante en los cultivos AAA que en los cultivos AAP. MMP1 y MMP3 están ausentes del suero de cultivo;
- 50 – un aumento de la expresión de MMP2 (C) durante la primera semana (D7) y una disminución durante la segunda semana (D14), luego un nuevo incremento que alcanza su máximo al D28. Se observa el mismo fenómeno en los dos tipos de cultivos de arterias, aunque MMP2 sigue expresándose mucho más después de la angioplastia (AAA) que dentro de los cultivos de AAP.

Además, las concentraciones en MMP2 son significativamente más bajas en el suero que en los sobrenadantes de cultivo;

- 5       – un incremento gradual de la expresión de TIMP-1 (D) durante las primeras dos semanas, sin diferencia significativa entre las dos series de cultivos de arterias. En cambio, durante las siguientes dos semanas, los cultivos AAA presentan un máximo de TIMP-1, mientras que la expresión de la enzima se estanca dentro de los cultivos AAP. TIMP-1 está ausente del suero de cultivo;
- 10       – un aumento de la expresión de TIMP-2 (E) la primera semana antes del estancamiento con coeficientes muy inferiores dentro de los cultivos AAP. Tras la angioplastia, se observa también un pico de expresión de TIMP-2 durante la primera semana antes del estancamiento a concentraciones muy elevadas. Además, TIMP-2 sigue expresándose mucho más después de la angioplastia que en los cultivos AAP. TIMP-2 está ausente del suero de cultivo.

### **Producción de MMP9**

- 15       Se analiza la expresión de MMP2 y MMP9, secretadas en el medio de cultivo organotípico de arterias AAA y AAP.

#### Evaluación de la actividad de MMP9 por zimografía-gelatina

- 20       Se diluyen a 3/5 70 µl de sobrenadante de cultivo organotípico de arterias (AAP y AAA) en Tris 1M pH 6,8 que contiene un 50% de glicerol y un 0,4% de azul de bromofenol, se someten a electroforesis en gel de poliacrilamida SDS al 10% que contiene 1 mg/ml de gelatina de piel de cerdo (Sigma, ref. G2500) en una solución tampón Laemmli, a 4°C, bajo 80 voltios en el gel de concentración y después bajo 180 voltios en el gel de separación. Después de la migración, se lavan los geles en Triton X-100 al 2,5% (2 veces 30 minutos a temperatura ambiente) y se incuban en una solución salina tampón, a 37°C, durante 48 horas. Luego se tiñen los geles con azul de Coomassie al 0,25% (Biorad, ref. R250) y se decoloran; las bandas de actividad enzimática aparecen traslúcidas, tal como se muestra en la Figura 11.

- 25       El análisis por morfometría informatizada posibilita la cuantificación de las actividades gelatinolíticas reveladas por la zimografía. La imagen del gel se transmite al ordenador mediante una cámara de vídeo. El programa (Imagenia 3000, station BIOCOM 200) transforma la intensidad de las bandas enzimáticas en niveles de gris: cuanto más elevada es la intensidad de banda, más elevado es el nivel de gris. La ausencia de lisis corresponde al nivel de gris 0, el máximo de lisis corresponde al nivel de gris 255. La superficie de banda se mide de forma semiautomática por definición de contorno. La cuantificación, en unidad arbitraria U, se obtiene mediante el producto del área S de la banda y del nivel de gris.

- 35       Los resultados muestran un aumento gradual y significativo de la actividad enzimática de MMP2 y MMP9 entre el D3 y el D28, que aparece más significativa después de la angioplastia (AAA) que en los cultivos AAP.

#### Evaluación de la expresión de MMP9 por dot-blot

Se realiza el dot-blot tal como se ha descrito en el Ejemplo 1 anterior, por medio de un anticuerpo humano dirigido contra la MMP9 (Valbiotech). A modo de control se investiga también la presencia de MMP9 en el suero de cultivo (STF). Los resultados se presentan en la Figura 12.

- 40       Los resultados muestran un aumento muy significativo de la MMP9 entre el D3 y el D28 tanto en el caso de los cultivos AAP como AAA (relación de 1 a 4). Además, a partir del D14, la expresión de MMP9 en los cultivos AAA es significativamente superior a la de los cultivos AAP. El suero de cultivo contiene una pequeña cantidad de MMP9, pero esta cantidad sigue siendo significativamente inferior con respecto a las concentraciones medidas en los sobrenadantes de cultivos organotípicos de arterias.

### **45       Secreción de citoquinas**

- 50       Se cuantifican las citoquinas IL-1β, IL-4, IL-6 y TGFβ en el sobrenadante de los cultivos de arterias los D3, D7, D14 y D28 mediante el ensayo ELISA tal como se describe en el Ejemplo 1 anterior, respectivamente por medio de los kits Quantikine® (R&D Systems, ref. DLB50), DuoSet® ELISA Development (R&D Systems, ref. DY204, ref. DY206 y DY240). Los valores medios obtenidos se transfieren en forma de histogramas y se analizan estadísticamente. Se presentan los resultados en la Figura 13.

Abscisa

A: cuantificación de IL-1β;

B: cuantificación de IL-6;

C: cuantificación de IL-4;

D: cuantificación de TGF $\beta$ ;

Ordenada = pg/ml de citoquinas secretadas cada 24 horas

5  $\square$  = cultivo de arterias AAP

■ = cultivo de arterias AAA (= después de angioplastia)

\* = prueba T de Student Fischer  $p < 0,05$

\*\* = prueba T de Student Fischer  $p < 0,02$

\*\*\* = prueba T de Student Fischer  $p < 0,01$

10 \*\*\*\* = prueba T de Student Fischer  $p < 0,001$

Los resultados muestran:

- un pico de secreción de IL-1 $\beta$  el D7, con una disminución brutal (A). Este fenómeno es 4 veces más importante después de la angioplastia que dentro de los cultivos AAP;
- 15 – un pico de secreción de IL-6 diferido (B) en comparación con el de IL-1 $\beta$ , pero relaciones AAP/AAA muy similares con las de IL-1 $\beta$ . Así, se vuelve a confirmar la coordinación funcional entre IL-1 $\beta$  e IL-6 mediante la correlación de su perfil de secreción;
- a partir de valores idénticos el D3, una disminución significativa de los coeficientes de IL-4 (C) dentro de los cultivos AAP (coeficiente: 3) y un incremento de forma proporcionalmente idéntica de los coeficientes de IL-4 después de la angioplastia (coeficiente x3);
- 20 – una reducción muy significativa de la secreción de TGF $\beta$  (D) dentro de los cultivos AAP (coeficiente: 2), pero un aumento muy importante después de la angioplastia (factor 20 entre el D3 y el D14).

#### Immunodetecciones indirectas de MMP9 y MMP3

25 Se rehidratan cortes de 7  $\mu$ m de espesor de cultivos AAA y AAP los D3 y D28 (dos baños de tolueno seguidos de soluciones de alcohol 100° y 95°), se tratan durante 2 minutos con pepsina al 0,2% (Sigma) diluida en ácido acético (1/10). Se enjuagan las preparaciones microscópicas en 0,1M PBS, pH 7,2, durante 10 minutos, luego en PBS-glicina al 1%, durante 30 minutos. Ambos enjuagues se realizan en PBS 1X.

30 Se recubren entonces los cortes con una solución de bloqueo (1% de BSA, PBS-Tween al 0,05% y suero de caballo al 10%) durante 30 minutos, a 37°C.

Se elimina la solución de bloqueo y se sustituye por un anticuerpo primario diluido en una solución que contiene BSA al 1% y PBS-Tween al 0,05%: 1/50 anti-MMP3 o anti-MMP9 [Oncogene (Merk Eurolab)]. Se cubren los cortes con el anticuerpo primario durante una noche a temperatura ambiente.

35 Se enjuagan las preparaciones microscópicas 3x10 minutos en PBS 1X. Se cubren entonces los cortes con un anticuerpo secundario biotinilado específico durante 90 minutos (Kit Vector Vestatatin® (ABC kit) Biovalley, Elite PK-6102). Se enjuagan las preparaciones microscópicas 3x en PBS 1X.

40 Se bloquean las peroxidasas endógenas mediante la adición de peróxido de hidrógeno sobre los cortes durante 20 minutos a 37°C. Se enjuagan las preparaciones microscópicas 2 veces en PBS 1X y 1 vez en PBS-NaCl al 3%. Se prepara el complejo avidina-biotina y se deposita en los cortes durante 45 minutos, a temperatura ambiente. Se enjuagan las preparaciones microscópicas 2 veces en PBS-NaCl al 3%, después en 0,1M Tris-HCl, pH 7,6.

Se realiza el revelado final con DAB (DiAminoBenzidina) en cada corte.

Se realiza una tinción de contraste con hemalum para mejorar el contraste entre el inmunomarcado de las peroxidasas y los cuerpos celulares.

45 Finalmente, se deshidratan los cortes mediante dos baños sucesivos de alcohol (95° y 100°) seguidos de dos baños de tolueno. Se montan las preparaciones microscópicas por medio de DEPEX (GURR®).

5 Dentro de los cultivos, AAP, MMP3 y MMP9 aparecen de forma difusa en la media el D3 antes de concentrarse a lo largo de la lámina elástica interna el D14 e invadir la íntima. El D3, el marcado de la MMP3 es mucho más intenso que el de la MMP9; pero se desarrolla el fenómeno opuesto progresivamente y, el D28, el marcado de la MMP9 es muy intenso en la media y especialmente en la íntima, mientras que se mantiene moderado para la MMP3.

10 Dentro de los cultivos AAA, la dispersión de la MMP9 aparece intensamente a lo largo de la lámina elástica interna el D3 antes de migrar hacia el área media de la neoíntima, para extenderse finalmente de forma difusa dentro de toda la media. La distribución de la MMP3 presenta una cinética claramente más moderada: el D3 su presencia es todavía difusa en la media y sólo el D7 la dispersión de la MMP3 se acumula a lo largo de la lámina elástica interna antes de migrar hacia el área media de la neoíntima el D14 y extenderse a toda la neoíntima el D28. Sin embargo, el marcado de la MMP3 sigue siendo menos intenso que el de la MMP9.

15 Estos resultados de inmunohistoquímica en preparaciones microscópicas de cultivos de arterias entre los D3 y D28 permiten confirmar una correlación entre el aumento de la fragmentación de las fibras elásticas y el aumento de la secreción de la MMP9.

#### **Ejemplo 5: Efectos de los co-cultivos de arterias y de fibroblastos gingivales sobre la producción de MMP9, TIMP-1 y sobre la red elástica**

##### **Obtención de co-cultivos de arterias y de fibroblastos gingivales**

20 Segmentos de arterias lesionadas de conejo (conejo aterosclerótico AAP) obtenidos tal como se ha descrito en el Ejemplo 3 anterior se cultivan en presencia de fibroblastos gingivales en las siguientes condiciones: 100.000 fibroblastos gingivales autólogos extraídos de un conejo 1 mes antes de su sacrificio para los co-cultivos de arterias / FG se mezclan con gel de colágeno antes de su polimerización, luego se deposita el fragmento arterial de 2 mm (alrededor de 3 mg) en medio del gel. Las técnicas de cultivo se describen en los Ejemplos 1 y 3 anteriores.

##### **25 Efectos de las interacciones FG / arterias sobre la expresión de MMP9 y de TIMP-1**

Se estudian las interacciones celulares entre los D3 y D21 (días de cultivo) mediante la expresión de MMP9 y TIMP-9 secretadas en el medio de co-cultivo de arterias y FG. A modo de control, la expresión de estas enzimas se analiza igualmente en cultivos de FG solos y en cultivos organotípicos de arterias en las mismas condiciones que las que se describen respectivamente en los Ejemplos 1 y 3 anteriores.

##### **30 Evaluación de la actividad de MMP2 y MMP9 por zimografía**

La expresión de MMP2 y MMP9 secretadas en el sobrenadante de co-cultivos de arterias y de FG los D14 y D21 se analiza por zimografía-gelatina. Se presentan los resultados en la Figura 14.

T: 10 µl estándar (100 µg/ml) de MMP9 recombinante (R&D Systems, ref. 911-MP) y de MMP2 recombinante (R&D Systems, ref. 902-MP);

35 A: cultivo celular de 100.000 FG en gel de colágeno;

B: cultivo de arterias en gel de colágeno;

C: co-cultivos de arterias y de 100.000 FG en gel de colágeno.

40 Los resultados muestran que los fibroblastos gingivales cultivados no expresan la MMP9 (A y D) a diferencia de los cultivos organotípicos de arterias (B y E). En cambio, los fibroblastos gingivales inhiben la secreción de MMP9 por las arterias co-cultivadas (C y F). Se observan los mismos resultados los D14 y D21. Con respecto a la MMP2, no se observa ninguna modificación significativa de la actividad de las formas libres de esta enzima. Parece que los fibroblastos gingivales no modifican la secreción de la MMP2 co-cultivada con las arterias.

##### **Evaluación de la expresión de MMP9 y TIMP-1 por dot-blot**

45 El análisis por dot-blot del sobrenadante de co-cultivos de arterias y fibroblastos gingivales entre el D3 y el D21 se realiza tal como se describe en el Ejemplo 1 anterior mediante anticuerpos anti-MMP9 y anti-TIMP-1. Los resultados de la secreción de MMP9 y TIMP-1 se presentan respectivamente en las Figuras 15 (A = dot-blot, B = cuantificación del dot-blot) y 16 (A = dot-blot, B = cuantificación del dot-blot).

Abscisa

50 T = control (10 pg de MMP9 recombinante, R&D Systems, ref. 911-MP);

FG = cultivo de 100.000 fibroblastos gingivales en gel de colágeno;

A = cultivo organotípico de arterias en gel de colágeno;

A/FG = co-cultivo de arterias y de 100.000 fibroblastos gingivales en gel de colágeno.

Ordenada = secreción de MMP9 (en pg).

- 5 Los resultados muestran que los fibroblastos gingivales inhiben la secreción de MMP9 en los co-cultivos de arterias y FG entre el D3 y el D21 (Figura 15). En paralelo, se observa un fuerte aumento de la secreción de TIMP-1 en los co-cultivos de A/FG en comparación con el que se detecta en los cultivos separados FG y A (Figura 16). Se obtienen los mismos resultados los D3, D7, D14 y D21.

#### Evaluación de la transcripción de MMP9 y TIMP-1 por RT PCR

- 10 La extracción de los ARNm de MMP9 y TIMP-1 a partir de co-cultivos de arterias y fibroblastos gingivales el D14, así como el análisis por RT PCR, se realizan tal como se describe en el Ejemplo 1 anterior con cebadores específicos de MMP9 y TIMP-1. Los resultados del análisis transcripcional de MMP9 y TIMP-1 se presentan en las Figuras 17 y 18, respectivamente.

S: estándar de peso molecular de ADN (kit Multiplex PCR®, BioSource International);

- 15 G: gel de colágeno solo;

FG: cultivo celular de FG (1 µg de ARN);

A: cultivo organotípico de arterias (1 µg de ARN);

A/FG: co-cultivo de arterias y de FG (1 µg de ARN).

- 20 Los resultados no muestran ninguna modificación transcripcional de MMP9 en los cultivos de arterias y los co-cultivos de arterias y FG (Figura 17). En cambio, se observa un aumento de la transcripción de TIMP-1 en los co-cultivos de arterias y FG en comparación con el que se observa en los cultivos de FG o de arterias (Figura 18), que está en correlación con el aumento de la secreción de TIMP-1 (Figura 16).

#### Cuantificación de los complejos MMP9/TIMP-1

- 25 La cuantificación de la expresión de complejos MMP9/TIMP-1 en los co-cultivos de arterias y fibroblastos gingivales el D14 se lleva a cabo mediante el ensayo ELISA tal como se describe en el Ejemplo 1 anterior. Se presentan los resultados en la Figura 19.

Abscisa

T = control (gel de colágeno solo)

- 30 FG = cultivo de 100.000 fibroblastos gingivales en gel de colágeno

A = cultivo organotípico de arterias en gel de colágeno

A/FG = co-cultivo de arterias y fibroblastos gingivales

Ordenada = secreción de complejos MMP9/TIMP-1 (pg/ml).

- 35 Los resultados muestran que la cantidad de complejos MMP9/TIMP-1 aumenta en los co-cultivos de arterias y FG (x 1,8).

El conjunto de resultados bioquímicos demuestra que los fibroblastos gingivales co-cultivados con arterias inhiben la actividad de MMP9 secretada por las CML arteriales, no disminuyendo la síntesis de la enzima sino induciendo un aumento de la síntesis de TIMP-1 y la formación de complejos MMP9/TIMP-1 inactivos, cualquiera que sea la duración del cultivo (de D3 a D21). Estos resultados *ex-vivo* confirman por tanto los que se observan *in vitro* (Ejemplo 1 anterior).

- 40

#### **Análisis de la red elástica**

Se observan bajo microscopio (x40) después de la tinción con orceína cortes de 7 µm procedentes de arterias lesionadas co-cultivadas con fibroblastos gingivales durante 3, 7 y 14 días. A modo de control, se analizan en las mismas condiciones cortes de arterias cultivadas solas tal como se describe en el Ejemplo 3 anterior. Se presentan los resultados en la Figura 20.

- 45

D3

A: arteria cultivada sola

B: arteria co-cultivada con fibroblastos gingivales

D7

5 C: arteria cultivada sola

D: arteria co-cultivada con fibroblastos gingivales

D21

E: arteria cultivada sola

F: arteria co-cultivada con fibroblastos gingivales

10 En las arterias cultivadas solas se observa un acortamiento y una desaparición progresiva de las fibras elásticas con el tiempo (A, C y E) mientras que, en las arterias co-cultivadas con FG, la red elástica sigue densa (B, D y F). Los resultados muestran por tanto una protección de la red elástica con el tiempo cuando las arterias se cultivan en presencia de fibroblastos gingivales.

15 De este estudio resulta que la conservación de la integridad de la red elástica de la media está en correlación con una disminución de la actividad de MMP9 consecutiva a un incremento de TIMP-1. El fibroblasto gingival aparece por tanto como una célula que puede modificar la remodelación vascular, reproduciendo en la arteria su potencial reparador expresado naturalmente en la encía.

#### **Ejemplo 6: Transplante de fibroblastos gingivales humanos *in vivo* en arterias de conejo**

20 El objetivo de este estudio es determinar la factibilidad de la inyección y la validación del marcado de los fibroblastos por nanopartículas verificadas por la tinción de Perl. Las células humanas inyectadas en conejos permiten visualizar por inmunodetección HLA si las células coloradas con Perl son realmente los fibroblastos inyectados. En efecto, las nanopartículas podrían escaparse de FG muertos y marcar unas CML de la media.

25 El transplante de fibroblastos gingivales humanos se realiza *in vivo* en arterias de conejo en dos modelos diferentes: un modelo de arterias normales y un modelo de aneurisma (modelo elastasa).

Los fibroblastos gingivales humanos son marcados en cultivo monocapa con las nanopartículas ferromagnéticas tal como se describe en el Ejemplo 1 anterior y después se tripsinizan.

El procedimiento de transplante es idéntico al que se describe en el Ejemplo 6 anterior. Se presentan los resultados en la Figura 21.

30 A: modelo de arterias normales (x10 y x40)

B: modelo de aneurisma (x5)

35 Los resultados muestran que existe una superposición del marcado HLA anti-humano y la tinción de Perl (Figura 21A), lo que confirma la validez de esta técnica de inyección. Las células tienen una morfología normal y se puede observar un sitio de penetración del INFILTRATOR en la arteria (véase la flecha en la Figura 21A, x40). La Figura 21B muestra una inyección de fibroblastos en una arteria con aneurisma.

#### **Ejemplo 7: Transplante de fibroblastos gingivales autólogos *in vivo* en arterias de conejo**

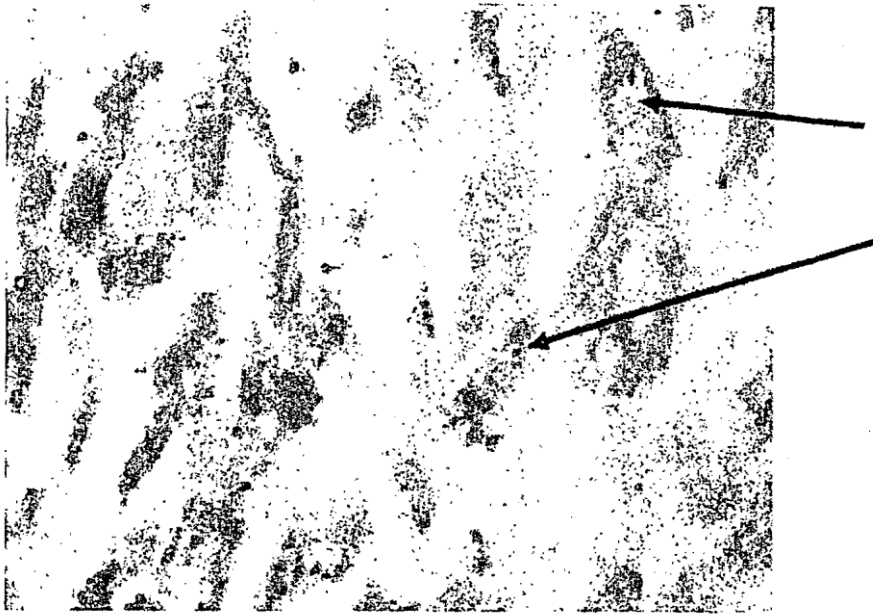
Los fibroblastos gingivales son marcados en cultivo monocapa por las nanopartículas ferromagnéticas tal como se describe en el Ejemplo 1 anterior y después se tripsinizan.

40 Se inyectan en distintas cantidades (de  $10^5$  a  $5 \times 10^6$  células) en las arterias ilíacas de conejo por medio de un catéter INFILTRATOR (Boston Scientific) (TEIGER y col., Eur. Heart J. 18: abstract suppl. 500, 1997). Se sacrifican los conejos 24 horas después de la inyección y se visualizan los sitios de inyección. Se presentan los resultados en la Figura 22.

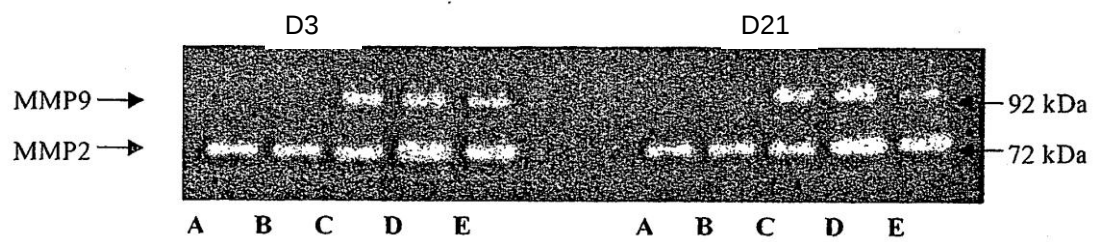
45 Con alto aumento (x 100), la tinción de Perl permite ver las nanopartículas en los cortes histológicos de 6  $\mu$ m. Los fibroblastos inyectados se localizan en la media y presentan una morfología normal.

**REIVINDICACIONES**

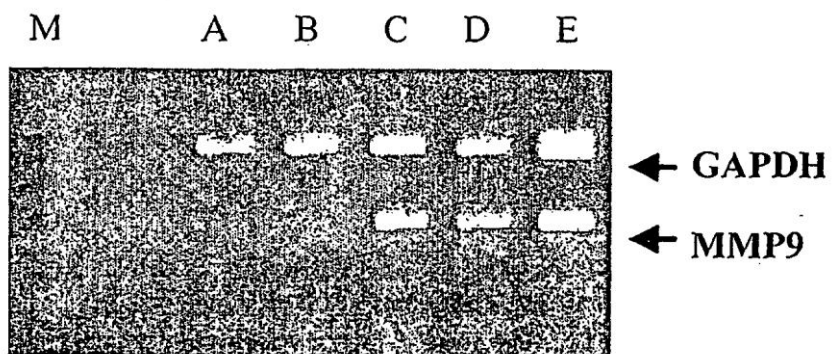
1. Utilización de fibroblastos gingivales para la obtención de una composición celular destinada al tratamiento de una patología de remodelación arterial.
2. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada porque dicha patología es un aneurisma.
- 5 3. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada porque dicha patología es una estenosis o restenosis después de una angioplastia.
4. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada porque dicha patología es una disección aórtica.
5. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada porque dicha patología es una aterosclerosis.
- 10 6. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque dichos fibroblastos proceden de tejido gingival previamente extraído en el sujeto al que se destina el tratamiento.



**Figura 1**



**Figura 2**



**Figura 3**

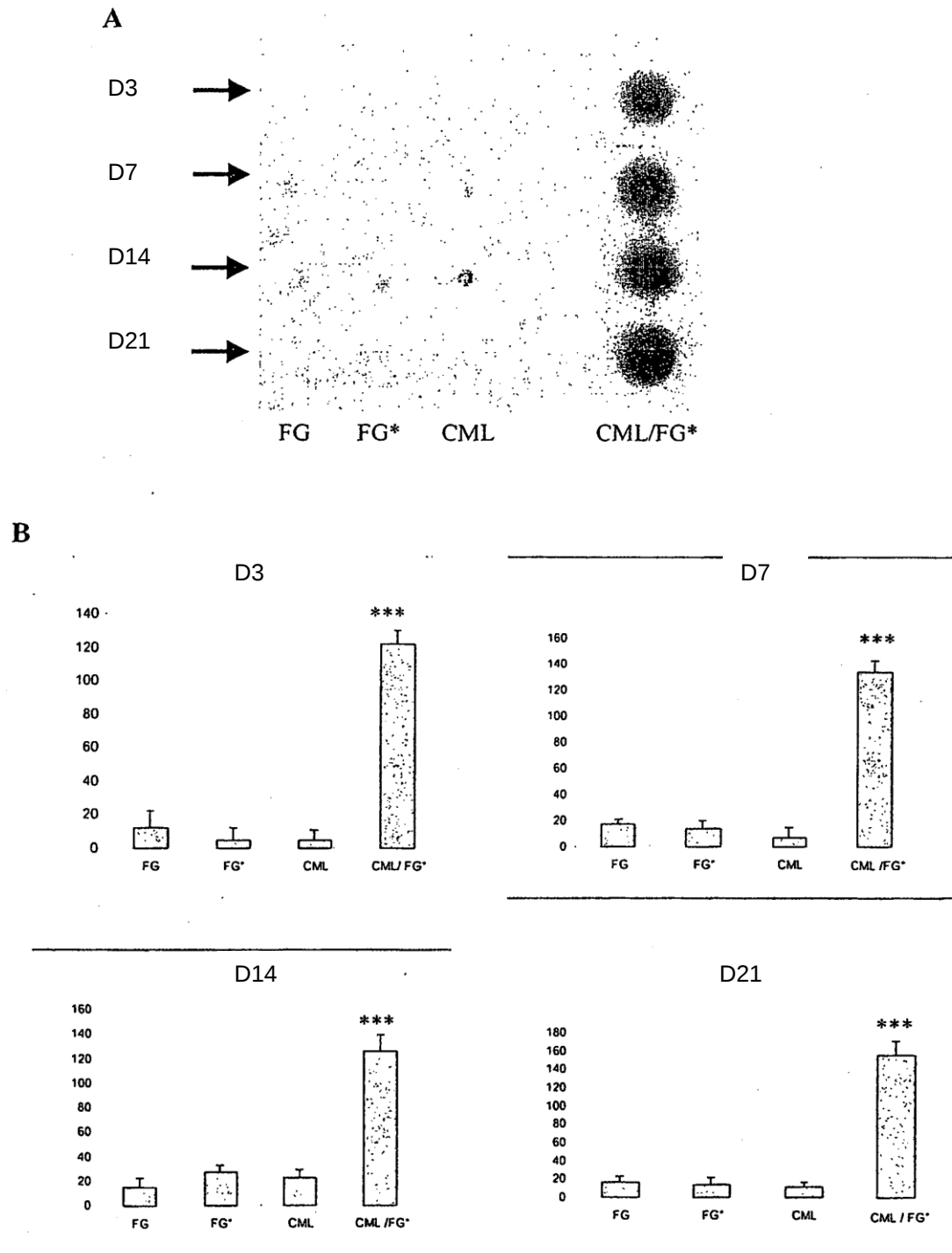


Figura 4

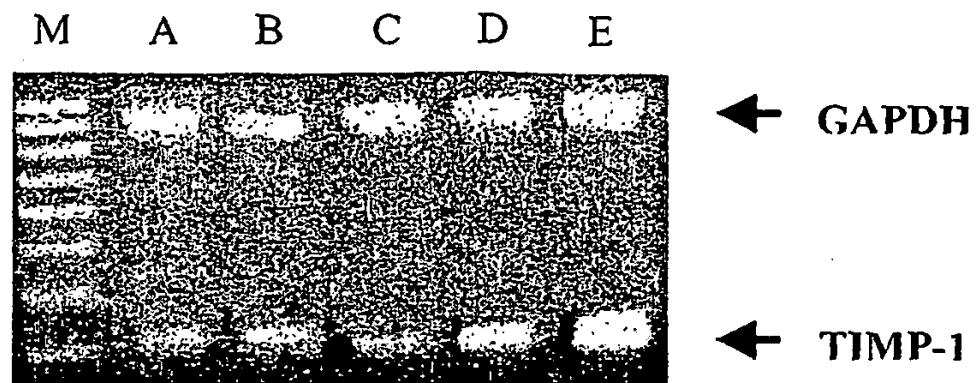


Figura 5

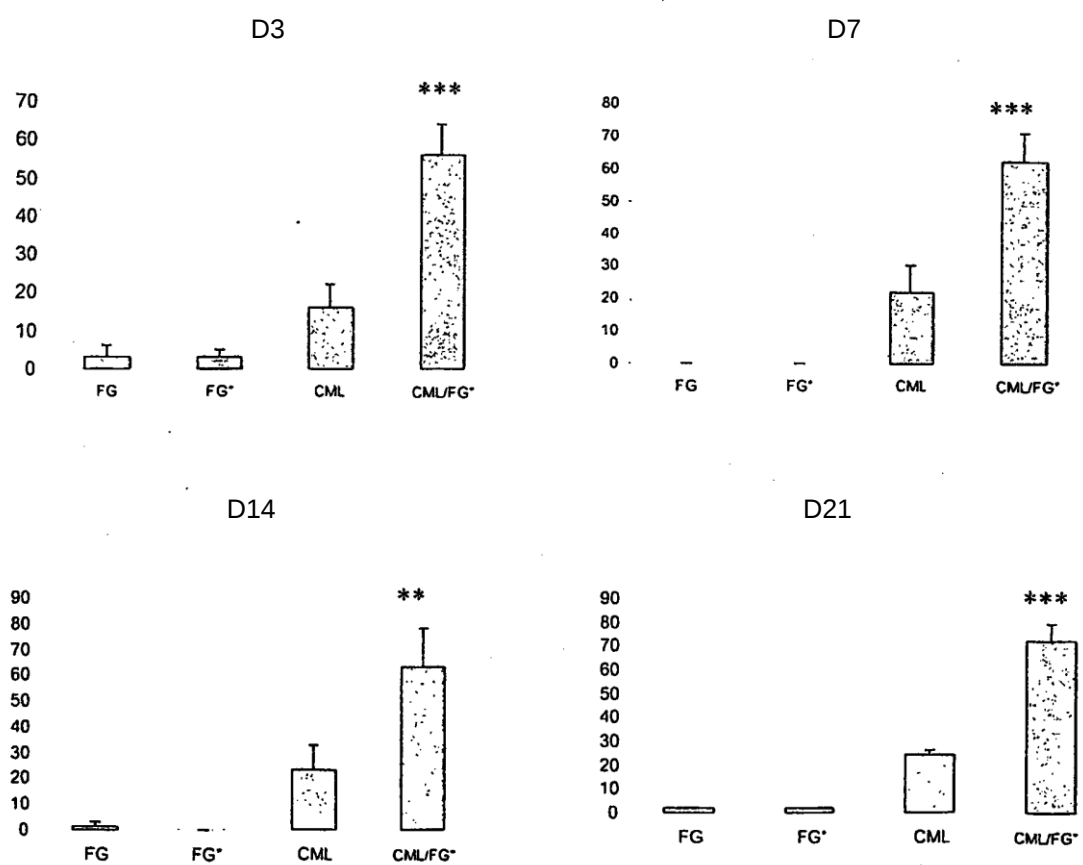


Figura 6

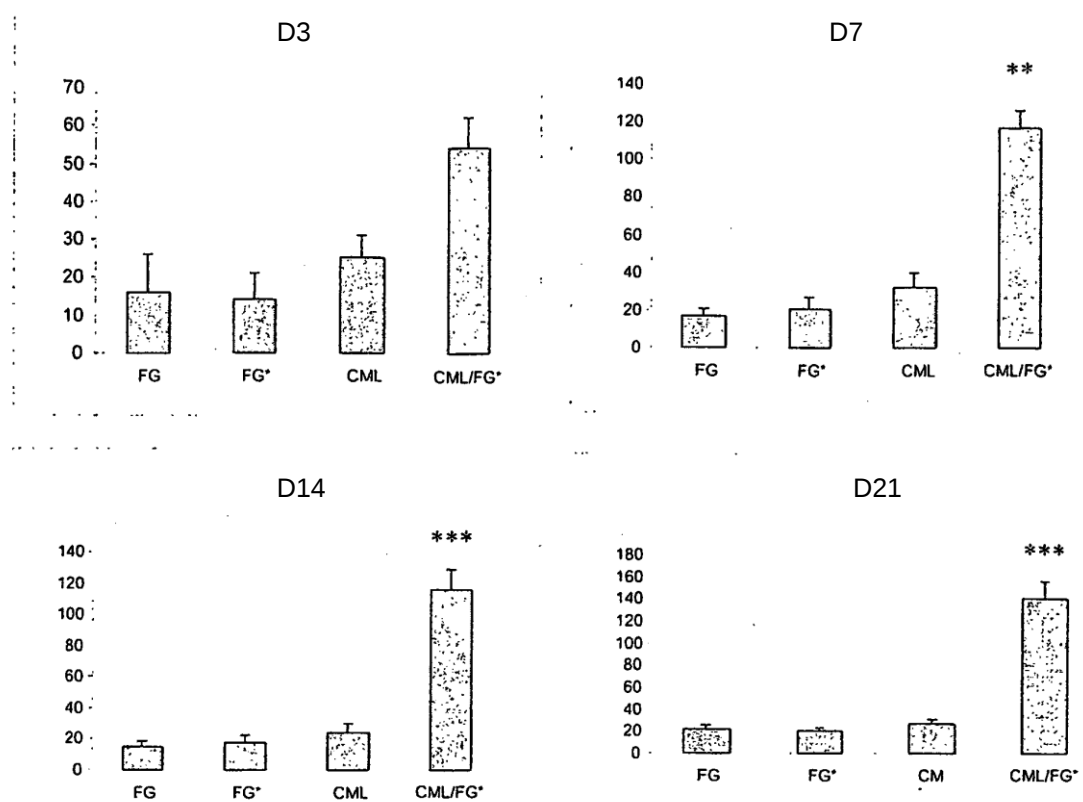


Figura 7

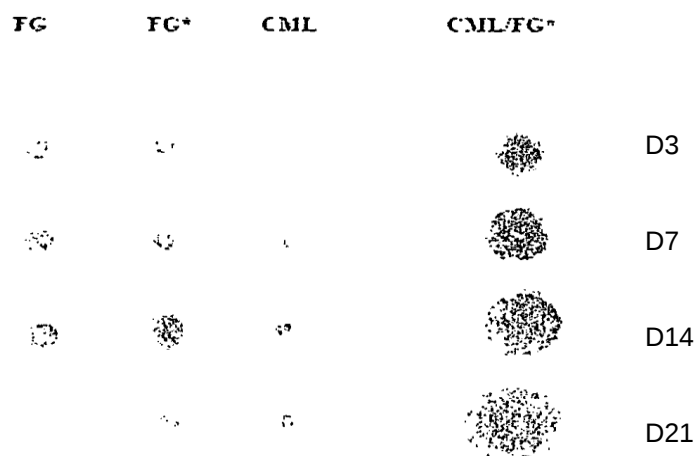


Figura 8

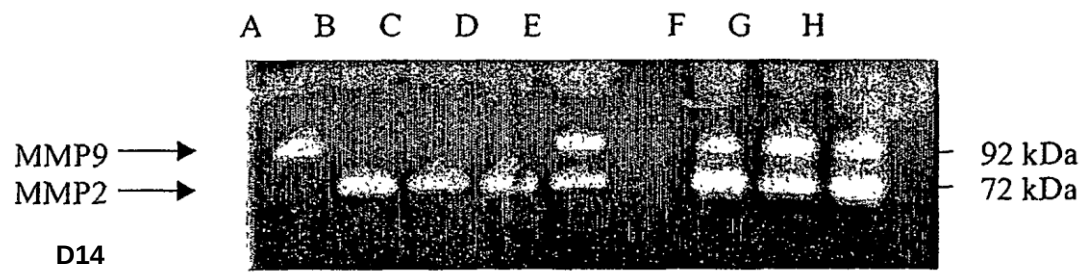
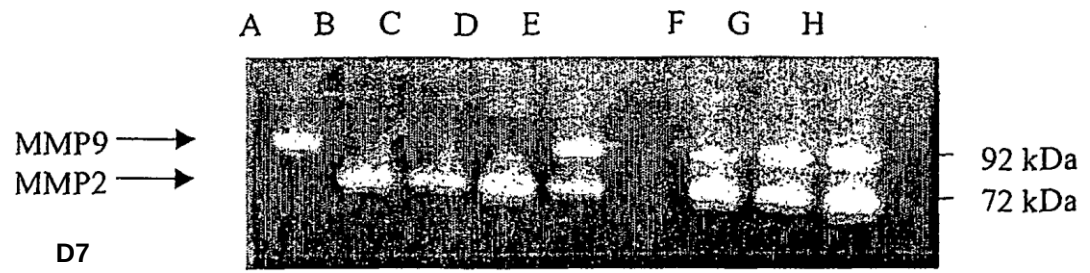


Figura 9

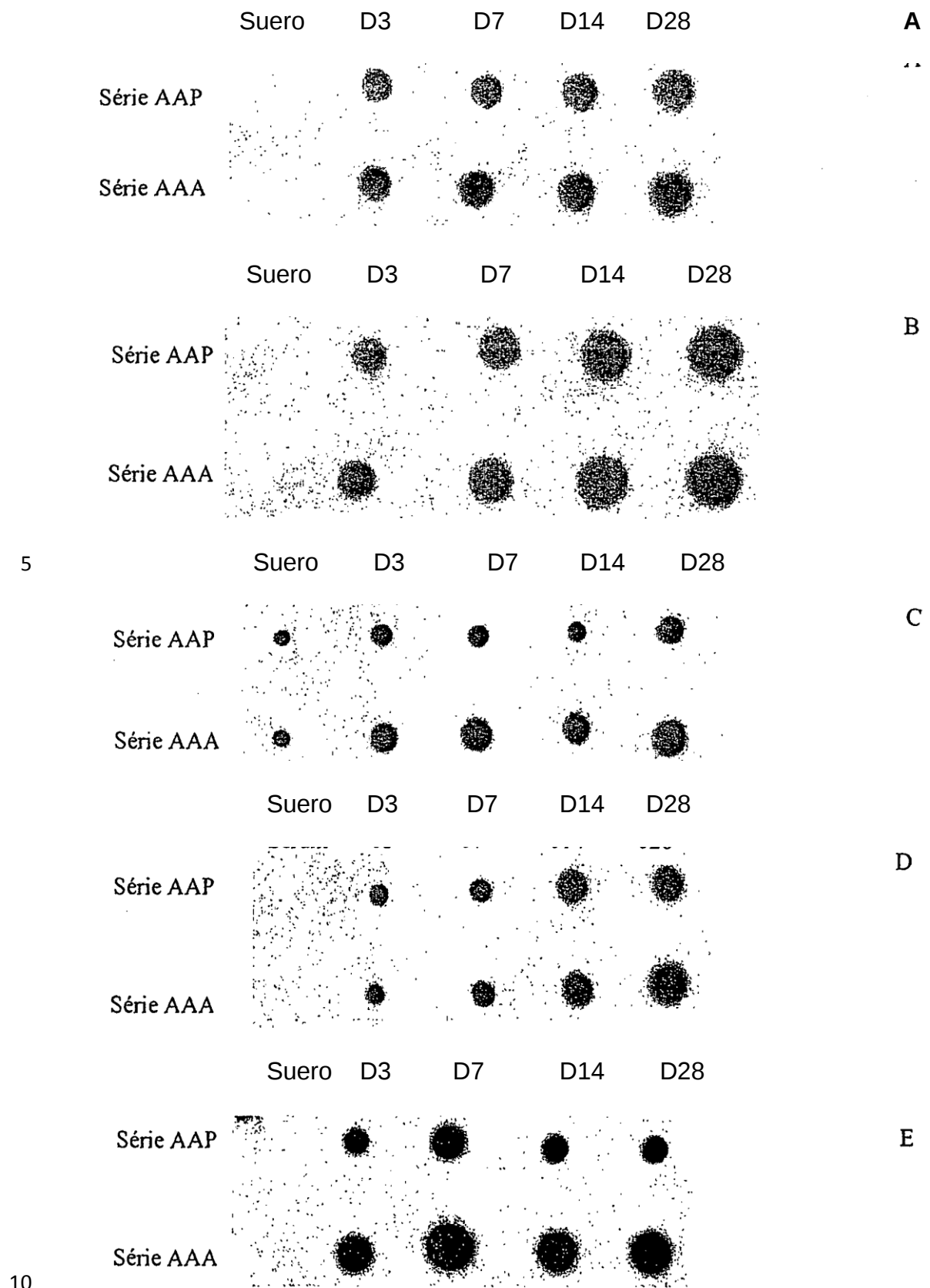
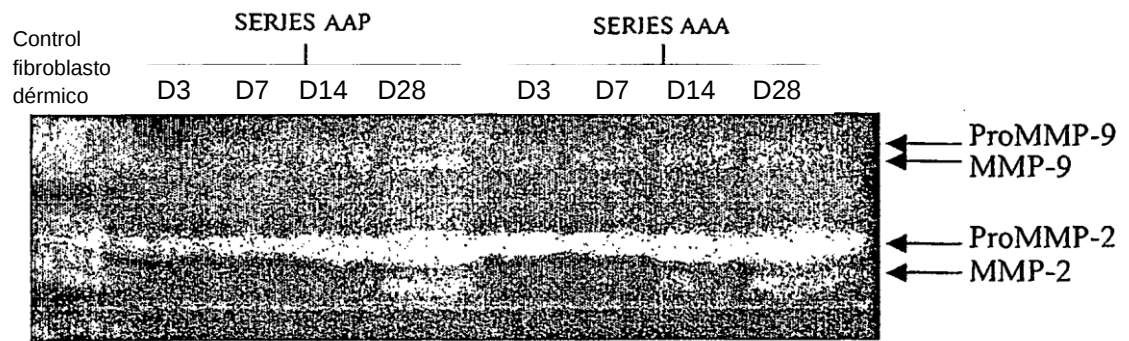
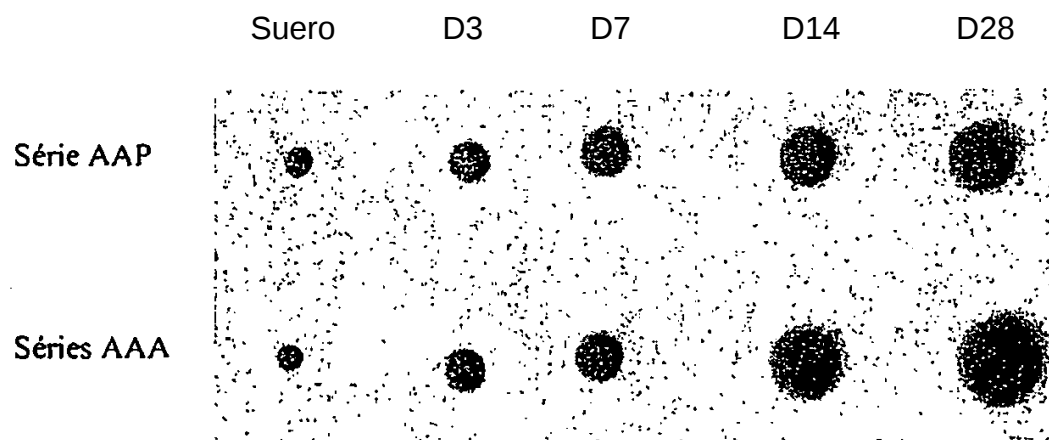


Figura 10

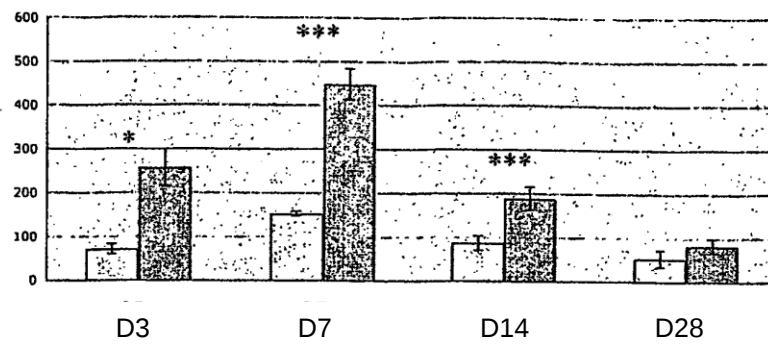


**Figura 11**

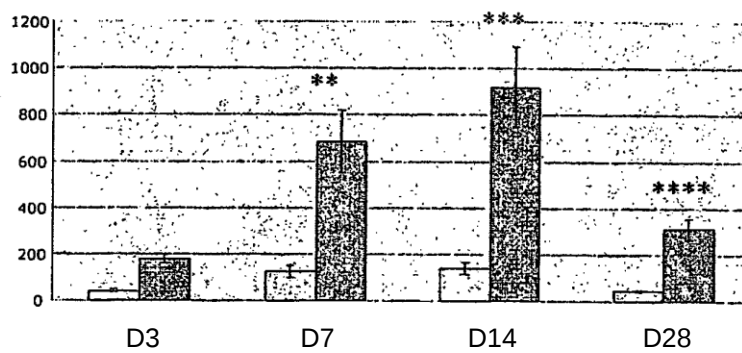


**Figura 12**

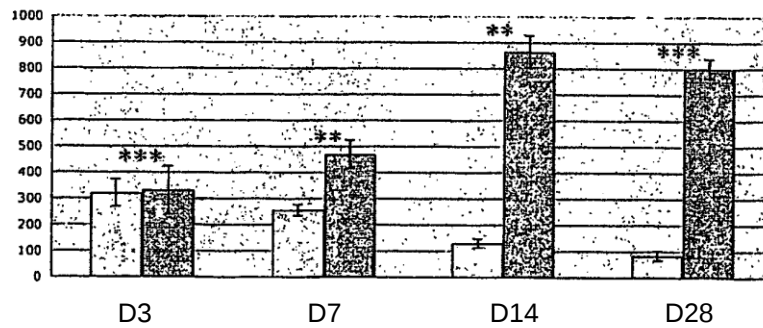
A



B



C



D

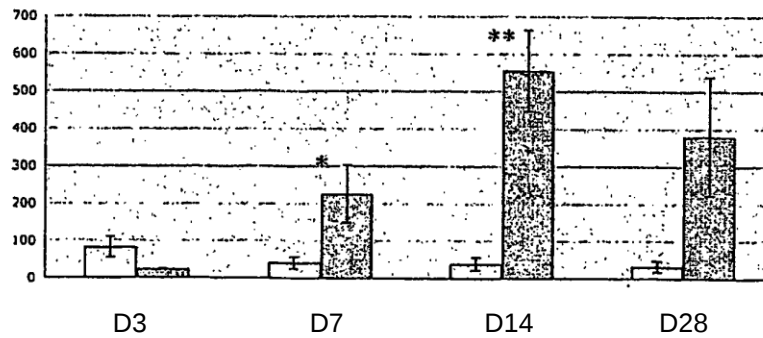
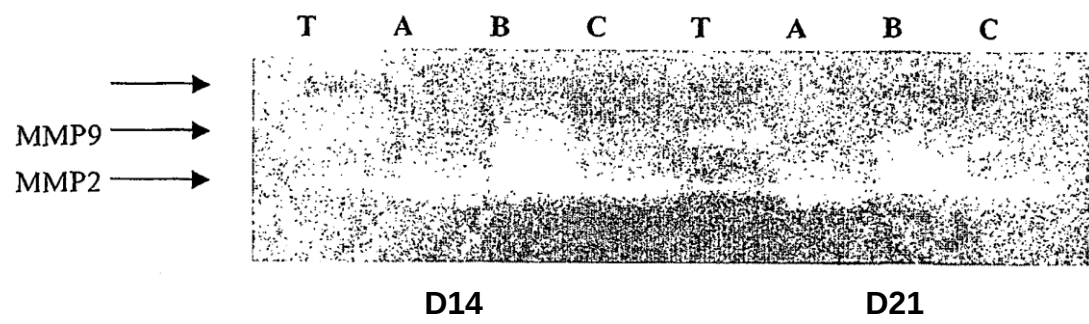
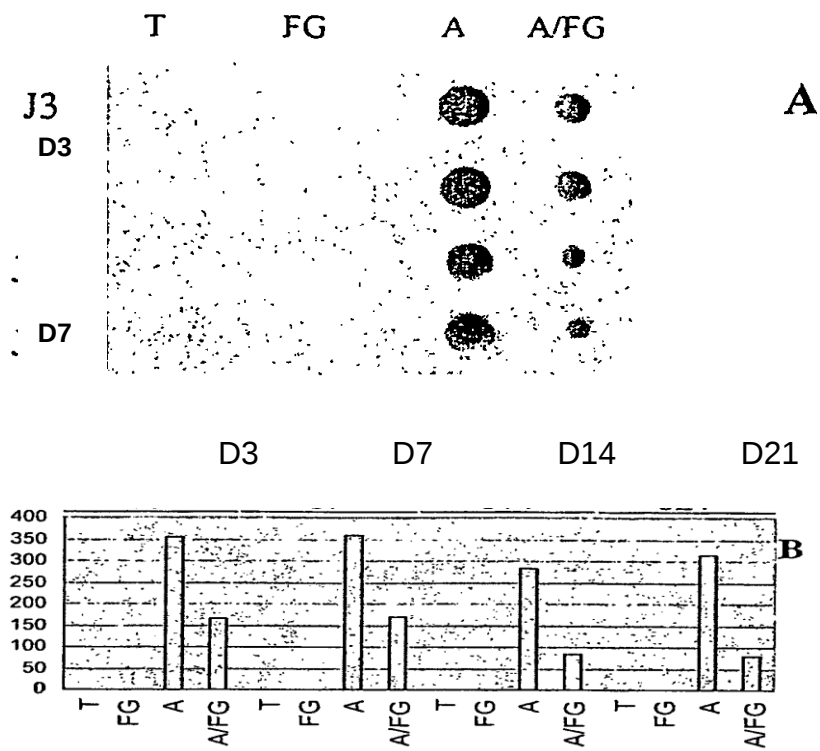


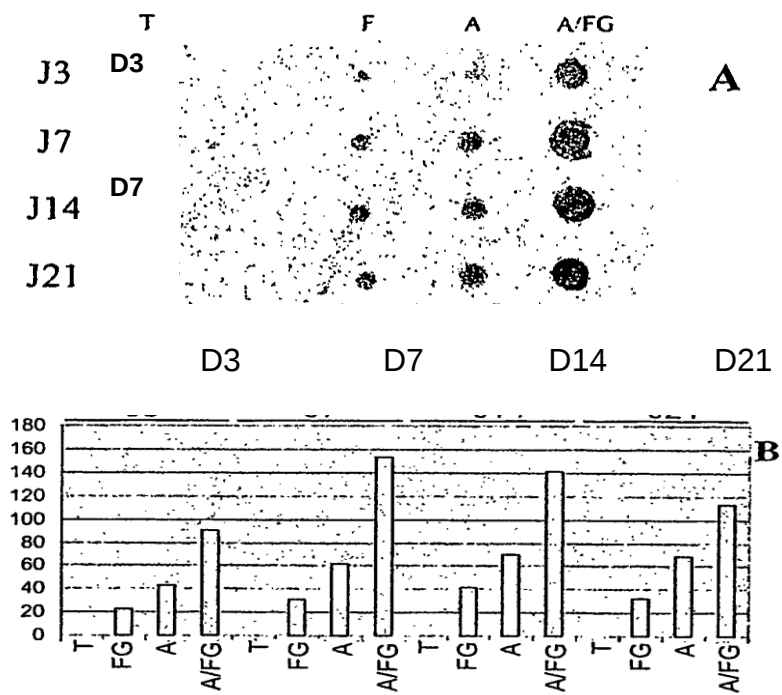
Figura 13



**Figura 14**



**Figura 15**



**Figura 16**

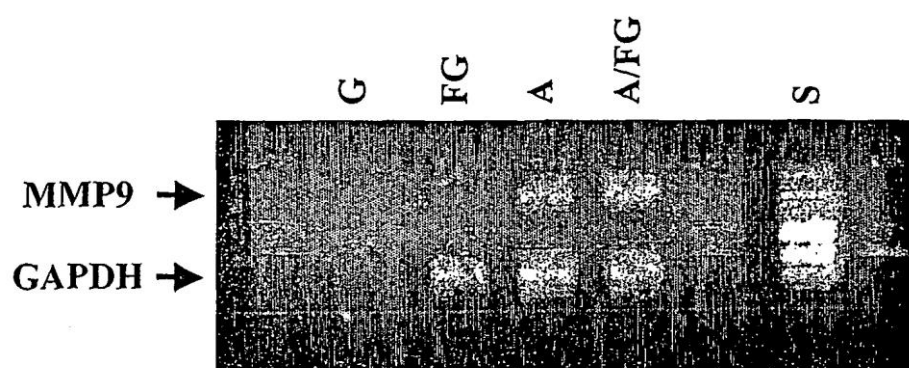


Figura 17

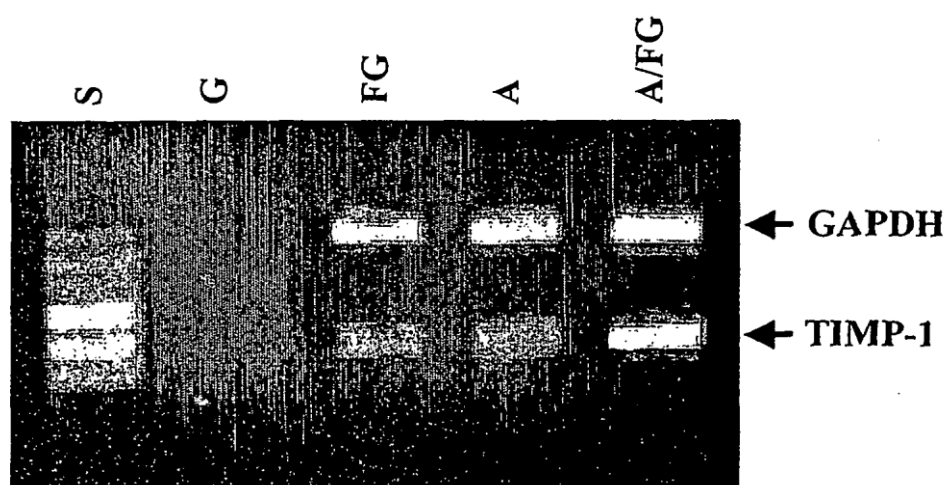


Figura 18

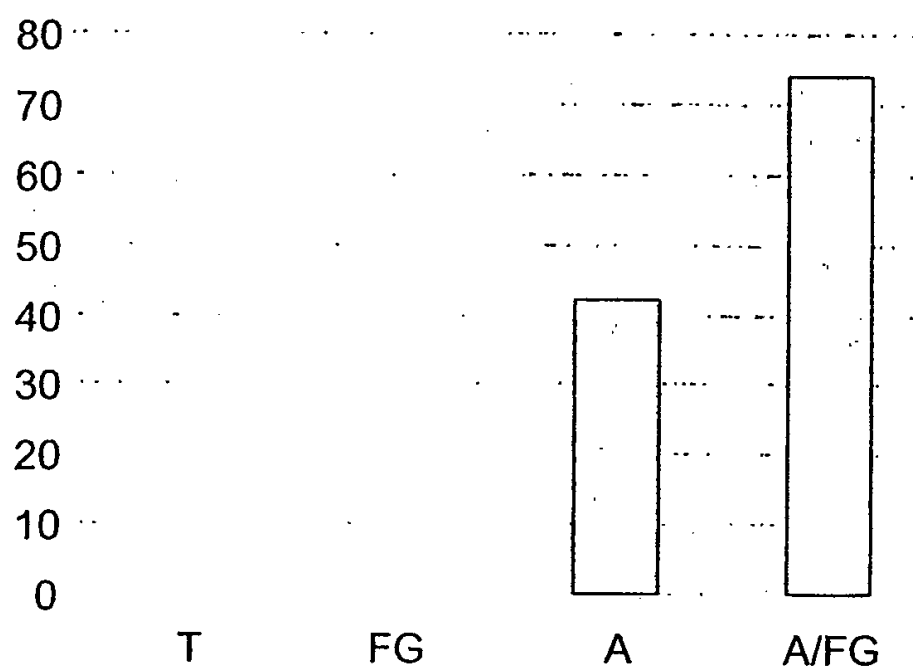
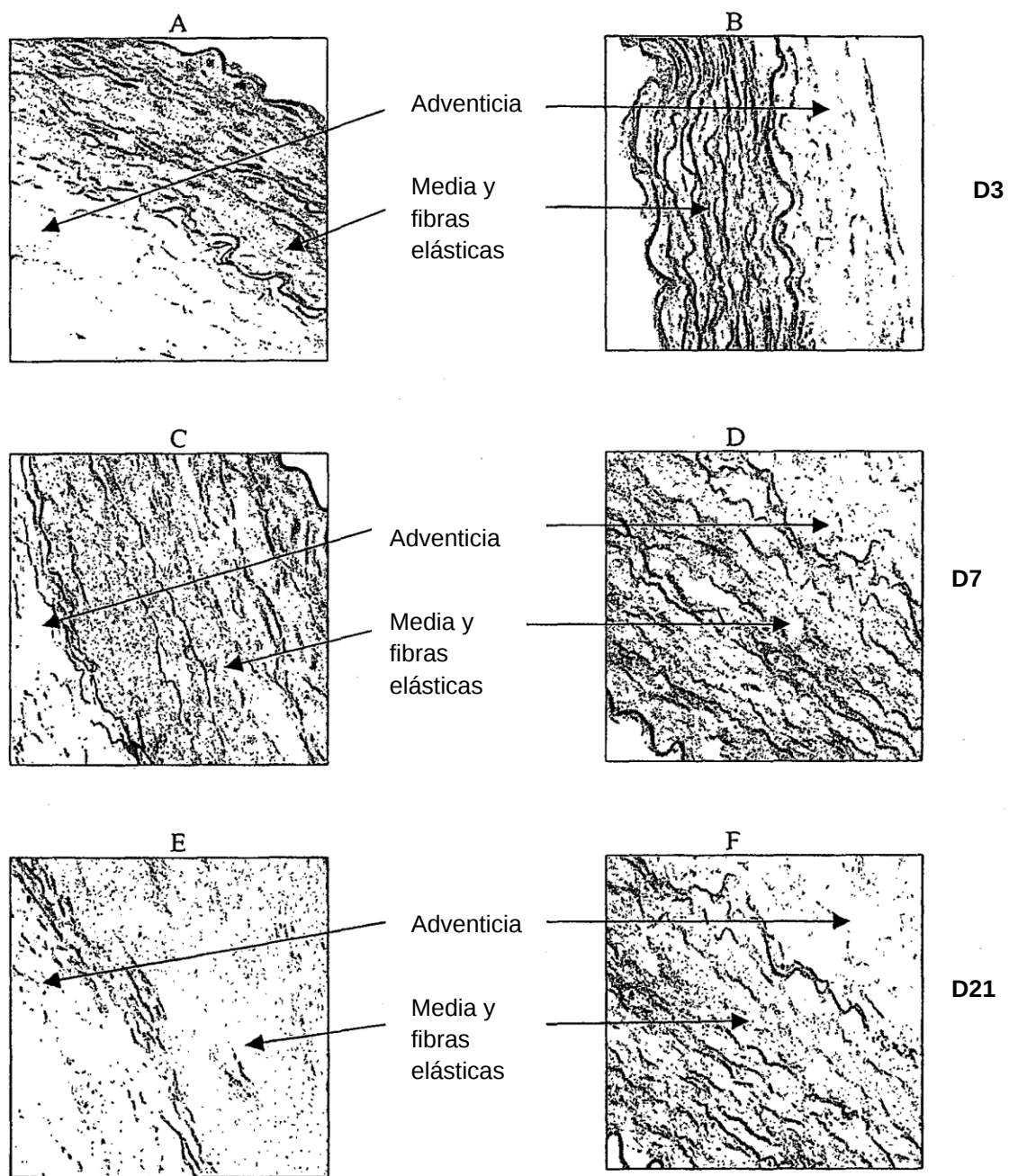
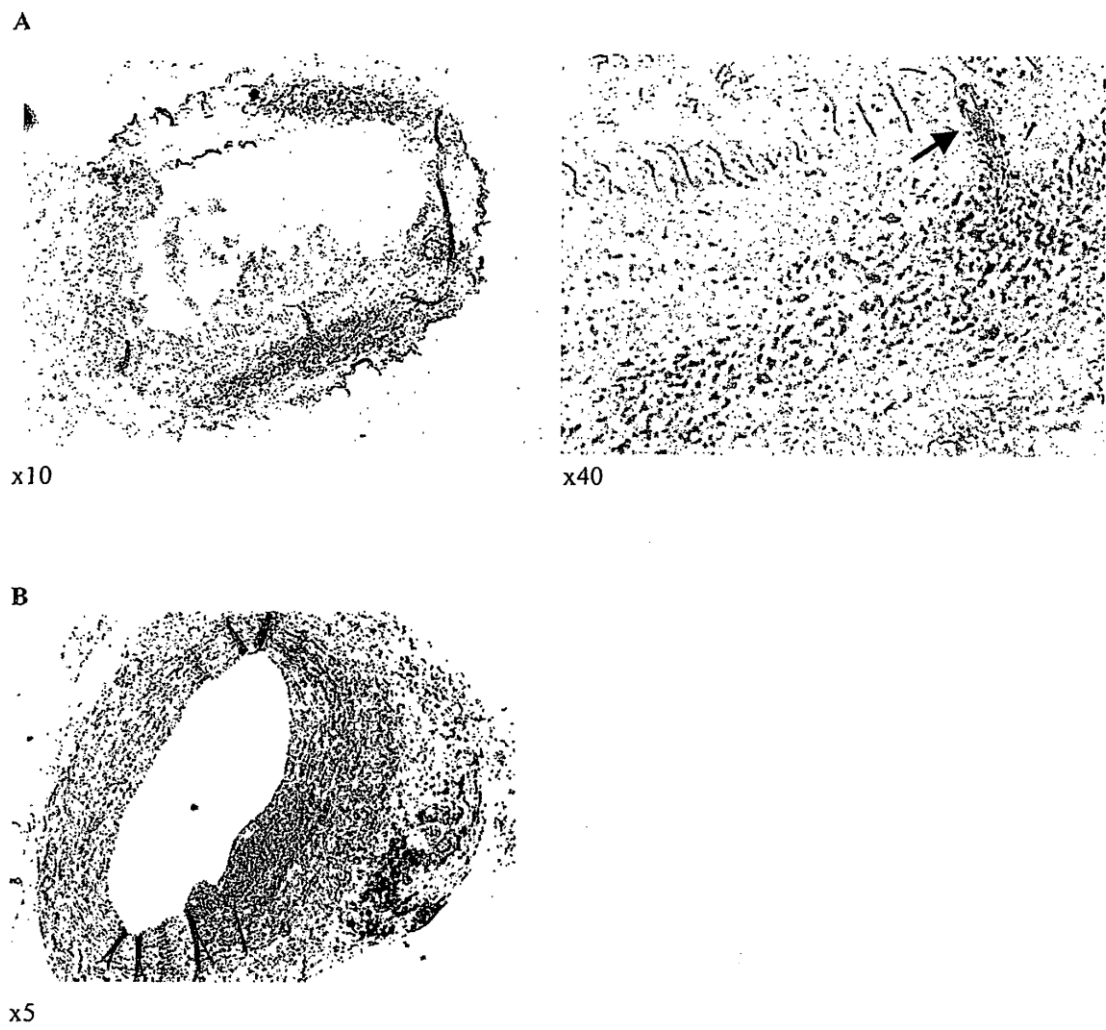


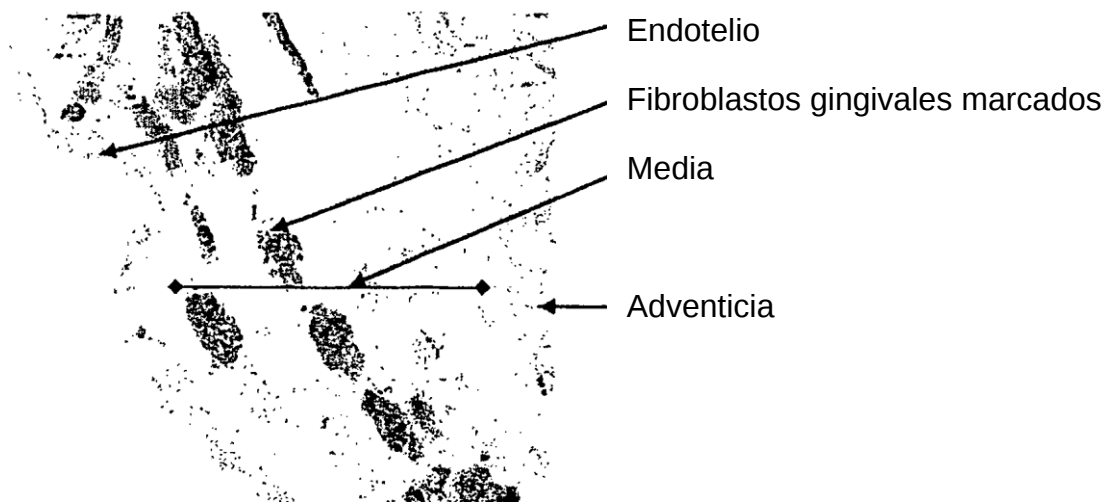
Figura 19



**Figura 20**



**Figura 21**



**X 100 (1 millón de fibroblastos gingivales inyectados)**

**Figura 22**