

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
6 de Abril de 2006 (06.04.2006)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2006/035083 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61L 17/00 (2006.01) C12N 5/08 (2006.01)

(74) Mandatario: ARIAS SANZ, Juan; ABG PATENTES,
S.L., Orense, 68 7º, E-28020 Madrid (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2005/000468

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible): AE,
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Fecha de presentación internacional:
17 de Agosto de 2005 (17.08.2005)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200402083 25 de Agosto de 2004 (25.08.2004) ES

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible): ARIPO
(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD,
RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo
US): CELLERIX, S.L. [ES/ES]; Parque Tecnológico de
Madrid, Marconi, 1, E-28760 Tres Cantos - Madrid (ES).
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID [ES/ES];
Ciudad Universitaria de Cantoblanco, Crta Colmenar
Viejo Km 15, E-28049 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente):
GONZÁLEZ DE LA PEÑA, Manuel [ES/ES]; Parque
Tecnológico de Madrid, Marconi, 1, E-28760 Tres Can-
tos - Madrid (ES). FERNÁNDEZ MIGUEL, Gemma
[ES/ES]; Parque Tecnológico de Madrid, Marconi, 1,
E-28760 Tres Cantos - Madrid (ES). GARCÍA-OLMO,
Damián [ES/ES]; Ciudad Universitaria de Cantoblanco,
Crta Colmenar Viejo Km 15, E-28049 Madrid (ES).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivin-
dicaciones y para ser republicada si se reciben modifica-
ciones

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: BIOMATERIAL FOR SUTURE

(54) Título: BIOMATERIAL PARA SUTURA

(57) Abstract: The invention relates to a biomaterial for suture and to the applications thereof. More specifically, the invention relates to a suture biomaterial which is covered with cells and which can be used to accelerate the repair process, thereby contributing to tissue healing in a biologically-active manner. The use of said biomaterial also produces less inflammation of the sutured tissue, thereby reducing the time it takes for an open wound to heal and minimising the risk of infection and fluid loss and, consequently, the number of surgical failures.

(57) Resumen: La presente invención hace referencia a un biomaterial para sutura y sus aplicaciones. Más concretamente, la presente invención se refiere a un biomaterial para sutura recubierto de células que permite acelerar el proceso de reparación, contribuyendo de manera biológicamente activa a la cicatrización del tejido. El uso de dicho biomaterial comporta también una menor inflamación del tejido en el que se realiza la sutura, lo cual permite disminuir el tiempo requerido para la curación de la herida abierta, minimizando el riesgo de infección y de pérdidas de fluidos orgánicos y con ello, el número de fracasos quirúrgicos.

WO 2006/035083 A1

BIOMATERIAL PARA SUTURA

Campo de la invención

5

La presente invención se refiere a un material para sutura y sus aplicaciones. En concreto, la invención se refiere a un material para sutura recubierto de células que contribuye de forma biológicamente activa en el proceso de reparación tisular y por ello en la cicatrización de las heridas.

10

Antecedentes de la invención

Toda herida abierta representa un riesgo de infección, así como una vía de escape de aire y fluidos orgánicos, por lo que su cierre se convierte en una urgente necesidad. En heridas superficiales de la piel, que no traspasan la dermis, se produce un cierre primario espontáneo por la toma de contacto de los bordes de la herida, mientras que en aquellas heridas dónde existe una clara separación de los tejidos, solamente la acción quirúrgica (sutura de la herida) puede conseguir este cierre primario, también denominado cura por primera intención.

20

Tradicionalmente, la sutura ha sido el método clásico para el afrontamiento de los bordes de la herida con vista a lograr la rápida cicatrización de los tejidos. La cura por primera intención mediante sutura, consiste en la aproximación de los bordes de la herida gracias a la introducción de un hilo de sutura en el tejido mediante una aguja metálica unida a uno de sus extremos y la realización de pases sucesivos entre ambos lados de la incisión facilitando de una forma pasiva el cierre de la herida.

25

Además, las suturas son utilizadas en la práctica quirúrgica para detener el sangrado (hemostasis), así como en la reparación de órganos y otras estructuras del cuerpo humano. En algunas situaciones estas suturas son especialmente delicadas por las dificultades de cicatrización de los tejidos en los que se asientan. Tal es el caso de las suturas de la pared del colon, los tendones así como en microcirugía en tejido nervioso y vasos sanguíneos.

30

Uno de los mayores inconvenientes que presenta la sutura de tejidos, es el hecho de que el diámetro de la aguja es mayor al del hilo, de manera que el punto de inserción

35

de la aguja no será totalmente ocupado por éste, generándose zonas por las que puede haber pérdida de fluidos. Este cierre deficiente de la herida es frecuentemente causa de complicaciones post-quirúrgicas, como por ejemplo, en el caso de anastomosis intestinales realizadas en pacientes afectos de carcinoma o diverticulosis, a los que se ha debido practicar una resección del segmento intestinal enfermo, para posteriormente unir los dos extremos sanos. En dichos pacientes, debido a un cierre incompleto, se pueden producir pérdidas de materia fecal con invasión de los tejidos circundantes, lo cuál será causa de peritonitis, con el consiguiente riesgo para la vida del paciente. Este riesgo se ve aumentado en pacientes que presentan una reducción del espesor de la pared intestinal, como en el caso de la enfermedad inflamatoria intestinal. En un intento de evitar las fugas de forma pasiva, se utilizan adhesivos biomédicos que serán aplicados sobre los puntos de sutura, de manera que quede sellada la apertura generada por el paso del hilo a través del tejido.

El uso de grapas representa una alternativa al método clásico de sutura. Permite realizar el cierre primario de los tejidos en un menor tiempo, reducir la pérdida de sangre, disminuir la contaminación y preservar el flujo sanguíneo. Un factor limitante en el empleo de grapas como método de cura por primera intención, es la necesidad de tener acceso a la parte superior e inferior del tejido a unir. Asimismo, debido a la fuerza ejercida al insertar las grapas pueden producirse desgarros en el tejido. Una solución a este problema, en un nuevo intento de contención pasiva, es decir, sin contribuir de forma biológicamente activa a la mejora del programa de la cicatrización y reparación de tejidos, es la aplicación de un bioadhesivo sobre la zona de inserción de la grapa.

Los adhesivos biocompatibles actúan facilitando la aposición de los tejidos proporcionando así una fuerza de tensión biomecánica estable y regular, a lo largo de todo el trayecto incisional, ayudando con esto al mantenimiento de la estructura tisular en el lugar de la lesión. Éstos pueden dividirse en dos categorías: adhesivos biológicos, sintetizados a partir de proteínas plasmáticas y polímeros sintéticos, principalmente cianoacrilato y sus derivados.

El mayor inconveniente que presentan los adhesivos de origen biológico es el riesgo de transmisión viral. Asimismo, los bioadhesivos sintéticos actualmente

disponibles tienen varios inconvenientes. En su mayoría son líquidos, siendo de difícil aplicación, de manera que su uso queda restringido a heridas superficiales. Por otra parte, son sustancias con carácter alérgico y potencialmente tóxico. Ha sido descrito que dichos materiales inducen una respuesta inflamatoria en el organismo, lo cual contribuye a retrasar la regeneración y cicatrización de los tejidos, limitando mucho su utilidad (Aronson *et al.*, 1970; Milde *et al.*, 1989). Por tanto, un método que permita el cierre de heridas y la sutura de tejidos sin inducir una respuesta inflamatoria, sin necesidad de que sean utilizados este tipo de adhesivos, representaría un avance especialmente importante en el caso de sutura de tejidos internos.

10

Por otra parte, la evolución de las suturas ha llegado a tal punto de refinamiento, que existen suturas específicamente diseñadas para cada tipo de intervención. El cirujano elige la sutura en función de la naturaleza del procedimiento, las características del paciente, la tensión que debe soportar la sutura,... Hay disponibles en el mercado una gran variedad de hilos de sutura: absorbibles y no absorbibles, de estructura monofilamento y multifilamento, así como de origen natural y sintético.

15

Con el objetivo de mejorar las características funcionales de los hilos de sutura, existen diversas patentes (GB577047, GB1401842, GB1430554, RU2125469) en que los hilos son impregnados de sustancias germicidas para evitar la contaminación de los puntos de sutura.

20

La patente europea EP0652017 protege biomateriales, en cuya definición estarían comprendidos los materiales de sutura, que han sido recubiertos para evitar la deposición sobre el hilo de constituyentes sanguíneos, y retrasar así la coagulación. En dicha patente se encuentra también descrito el uso de anticoagulantes y sustancias con propiedades antiinflamatorias como material de recubrimiento del biomaterial.

25

La patente US6264675 protege un material de sutura que comprende un hilo de sutura recubierto de un material adhesivo cuyas propiedades de adhesión se activan al ser insertado en el tejido a reparar, el cual se encuentra unido a una aguja por uno de sus extremos. El bioadhesivo utilizado en dicha invención solventa uno de los principales problemas asociados al método de sutura, ya que evita las pérdidas de fluidos a través

30

de los puntos de inserción de la aguja. No obstante, presenta como inconvenientes el carácter alérgico y potencial toxicidad inherente a la propia naturaleza de los bioadhesivos.

Hay que tener en cuenta que todos los materiales de sutura inducen “per se” una respuesta inmunológica del organismo por reconocimiento de un cuerpo extraño, lo que sistemáticamente entorpece la cicatrización natural de los tejidos. Por ello conseguir ocultar el material extraño al sistema inmunológico, mediante un recubrimiento celular, preferiblemente autólogo, sería de nuevo un avance especialmente importante en los casos de suturas comprometidas.

10

A pesar del grado de sofisticación alcanzado por las suturas, los métodos de sutura citados contribuyen a la aposición de los tejidos de manera pasiva, sin participar de forma biológicamente activa en la cicatrización del tejido.

15

Por otra parte, se conocen diversas poblaciones celulares presentes en el adulto, capaces de contribuir a la reparación de tejidos conectivos. Así, por ejemplo, el estroma de la médula ósea contiene, entre otras, una población de células denominadas células madre mesenquimales (Friedenstein *et al.*, 1976; Caplan *et al.*, 1991; Pittenger *et al.*, 1999). Estudios realizados en estas células, han demostrado que pueden diferenciarse a distintos linajes celulares mesenquimales, como adipocitos (Beresford *et al.*, 1992), condrocitos (Johnstone *et al.*, 1998), mioblastos (Wakitani *et al.*, 1995) y osteoblastos (Haynesworth *et al.*, 1992). Asimismo, en el tejido adiposo, que al igual que la médula ósea deriva del mesoderma embrionario y está constituido por una población celular heterogénea, se han identificado células madre multipotenciales, que pueden ser fácilmente aisladas (Zuk *et al.*, 2001). Estas células son similares, aunque no idénticas, a las células madre mesenquimales de la médula ósea (De Ugarte *et al.*, 2003) y son también capaces de diferenciarse a múltiples linajes celulares mesenquimales (condrocitos, osteocitos, adipocitos y mioblastos). Además, al igual que las células madre mesenquimales procedentes de médula ósea, presentan capacidad de diferenciación a neuronas (Zuk *et al.*, 2002).

25

30

La capacidad de establecer uniones entre tejidos biológicos ha sido uno de los principales retos en la investigación biomédica. La sutura ideal es aquella que presenta

características de resistencia y fácil manejo, no induce una respuesta inflamatoria del tejido y no promueve la infección. Es decir, aquella cuyo uso no sólo permite el cierre de la herida sino que contribuye a su completa curación.

5 La presente invención hace referencia a un material para sutura que permite acercar los extremos tisulares, facilitando la cura por primera intención, y a su vez acelerar el proceso de reparación, contribuyendo de manera biológicamente activa a la cicatrización del tejido. El uso de dicho material comporta también una menor inflamación del tejido en el que se realiza la sutura, lo cual permite disminuir el tiempo
10 requerido para la curación de la herida abierta, minimizando el riesgo de infección y de pérdidas de fluidos orgánicos y con ello, el número de fracasos quirúrgicos.

Explicación de la invención

15 El biomaterial para sutura de la presente invención comprende un material de sutura fisiológicamente compatible, denominado material de soporte, recubierto de una población celular con capacidad proliferativa y/o de diferenciación, características necesarias de cara a su participación en la regeneración del tejido en el que se realice la sutura. Así, este biomaterial para sutura no se limita a aproximar los dos extremos de la
20 herida abierta, sino que a su vez contribuye activamente en su cicatrización acelerando el proceso de reparación tisular. Dicha innovación representa una importante ventaja, en especial en el caso de sutura en órganos internos, y en particular en el caso de anastomosis intestinales, resultado de resecciones del tracto gastrointestinal o en la zona urogenital.

25 En un primer aspecto, de la invención proporciona un biomaterial para sutura, útil como agente terapéutico en el tratamiento de heridas, tanto accidentales como quirúrgicas y en la sutura de tejidos. Este biomaterial comprende un material de soporte para sutura y una población celular, caracterizada por presentar capacidad proliferativa
30 y/o de diferenciación, recubriendo dicho material de soporte.

En una realización particular, el material de soporte para sutura utilizado incluye pero no se limita a grapas, hilos absorbibles, hilos no absorbibles, hilos de origen

natural, hilos de origen sintético, hilos de estructura monofilamento e hilos de estructura multifilamento (también denominados trenzados).

5 En otra realización particular, el material de soporte para sutura utilizado incluye pero no se limita a hilos absorbibles, hilos no absorbibles, hilos de origen natural, hilos de origen sintético, hilos de estructura monofilamento e hilos de estructura multifilamento o trenzados, unidos a una aguja para sutura.

10 En una realización particular, la invención proporciona un biomaterial para sutura que comprende un hilo de sutura unido a una aguja por uno de sus extremos como material de soporte y como población celular de recubrimiento células madre adultas multipotentes de origen mesodérmico

15 En una realización particular más preferida, el material de soporte para sutura utilizado son hilos absorbibles, de origen sintético, de estructura monofilamento, unidos a una aguja para sutura.

20 En un segundo aspecto, la invención comprende utilizar células con capacidad proliferativa y/o de diferenciación, como población celular de recubrimiento de un material de soporte para sutura.

Una realización particular de la invención comprende el utilizar células madre como población celular de recubrimiento del biomaterial para sutura.

25 Una realización particular más preferida comprende el utilizar células madre pluripotentes, capaces de diferenciar a cualquier tipo de tejido, como población celular de recubrimiento del biomaterial para sutura.

30 Una realización particular aún más preferida comprende el utilizar células madre multipotentes capaces de diferenciar a diversos tipos de tejido, como población celular de recubrimiento del biomaterial para sutura.

En una realización preferida de la invención, las células madre adultas multipotentes, capaces de diferenciarse a diferentes tipos celulares, utilizadas como población de recubrimiento son aisladas a partir de tejido adiposo humano. En humanos la fuente preferida de tejido adiposo es el tejido graso subdérmico, siendo el método preferido de recolección el lipoaspirado.

Una realización particular de la invención comprende el utilizar como población celular de recubrimiento células de origen autólogo o alogénico o xenogénico, o bien combinaciones de éstas.

Otra realización particular preferida de la invención comprende el uso de células madre adultas multipotentes de origen alogénico como población celular de recubrimiento del biomaterial para sutura de la invención.

Una realización particular más preferida de la invención comprende el uso de células madre mesenquimales de origen alogénico como población celular de recubrimiento del biomaterial para sutura de la invención, incluyendo células madre aisladas de tejidos mesodérmicos tales como, pero sin limitarse a: médula ósea, dermis, tejido adiposo y músculo esquelético. Ha sido descrito por otros autores el carácter no inmunogénico de células madre mesenquimales aisladas de médula ósea, las cuáles escapan al reconocimiento de las células T aloreactivas en ensayos *in vitro* (Tse *et al.* 2003). Dicha característica otorga a las células madre mesenquimales de un donante alogénico la propiedad de poder ser utilizadas en cualquier paciente, independientemente de que exista una incompatibilidad de complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Así pues, el uso de células madre mesenquimales de un donante alogénico supone una fuente alternativa a las células madre mesenquimales de origen autólogo para su uso en terapia.

Preferentemente, la población celular de recubrimiento serán células de origen autólogo. Una realización particular especialmente preferida comprende el utilizar células madre adultas multipotentes autólogas aisladas de lipoaspirado, como población celular de recubrimiento del biomaterial para sutura de la invención (Ejemplo 1). El uso de células madre adultas autólogas presenta como ventaja que por su naturaleza son inmunocompatibles, y por tanto, no generan problemas de inflamación, ni rechazo.

Además su uso no presenta impedimentos de tipo ético y legal. En una realización preferida de la invención, dicho biomaterial para sutura comprende como población celular de recubrimiento células madre adultas autólogas siendo su uso restringido al paciente del cual proceden dichas células.

5

Una realización particular de la invención comprende el utilizar células madre, que expresen al menos una característica propia de una célula especializada, como población celular de recubrimiento del biomaterial para sutura de la invención.

10

Una realización preferida de la invención comprende el utilizar células progenitoras de un linaje celular especializado y obtenidas a partir de células madre del paciente, que expresen al menos una característica propia de célula progenitora especializada, como población celular de recubrimiento del biomaterial para sutura de la invención. Por tanto, no se generarán problemas de inflamación, ni rechazo, más aún los componentes de los materiales de sutura quedarían ocultos al sistema inmunológico por el recubrimiento con células madre autólogas, lo que sin duda mejoraría el proceso reparativo.

15

Una realización particular preferida comprende el utilizar células madre que han sido inducidas a diferenciarse *in vitro* a células que expresen al menos una característica propia de una célula especializada, como población celular de recubrimiento del biomaterial para sutura.

20

Una realización particular más preferida comprende el utilizar células madre multipotentes, que han sido inducidas a diferenciarse *in vitro* a células que expresen al menos una característica propia de una célula especializada, como población celular de recubrimiento del biomaterial para sutura. Que incluye pero no se limita a los siguientes tipos celulares: célula epitelial, célula endotelial, adipocito, miocito, condrocito, osteocito, neurona, astrocito, oligodendrocito, hepatocito y célula pancreática.

25

30

Una realización particular preferida de la invención comprende el biomaterial para sutura de la invención, en el que la población celular de recubrimiento ha sido genéticamente modificada.

Una realización particular preferida comprende el biomaterial para sutura, en el que la población celular de recubrimiento ha sido genéticamente modificada de manera que exprese factores que contribuyan al proceso de reparación tisular, que incluyen pero
5 no se limitan a: factores de crecimiento, factores morfogenéticos, proteínas estructurales y citoquinas.

Otra realización preferida de la invención comprende el biomaterial para sutura de la invención, en el que la población celular de recubrimiento está constituida por una
10 población celular heterogénea. Se define población celular heterogénea como aquella que comprende células de distintos tipos celulares o células en diferentes estadios de diferenciación o bien combinaciones de ambas.

Un tercer aspecto de la invención proporciona un método para la obtención del
15 biomaterial para sutura de la invención, en el que la población celular de recubrimiento se une al material de soporte, preferiblemente mediante adhesión.

Una realización particular preferida de la invención proporciona un método para la obtención del biomaterial para sutura en el que la población celular de recubrimiento
20 se une al material de soporte, preferiblemente mediante adhesión. Dicho método comprende:

1. expandir la población celular de elección;
2. sumergir el material de sutura en un medio de cultivo adecuado para dicha
25 población celular;
3. inocular una suspensión de la población celular pre-cultivada sobre el material de sutura;
4. cultivar la preparación anterior en condiciones adecuadas, que incluye pero no se limita a cultivo en placas y cultivo dinámico en tubos;
- 30 5. aislar el material de soporte que presenta un recubrimiento celular adecuado.

Las etapas de expansión y cultivo de la población celular utilizada en el recubrimiento del material de soporte del biomaterial, serán evidentes para cualquier experto en la materia.

Una realización particular más preferida de la invención proporciona un método para la obtención del biomaterial para sutura, en el que el material de soporte ha sido previamente recubierto de un material cuya función es aumentar la adhesión de la población celular de recubrimiento. Dicho material de recubrimiento del material de soporte incluye pero no se limita a péptidos, antígenos proteicos, anticuerpos, azúcares y lípidos. En una realización particular aún más preferida, dicho material de recubrimiento son proteínas de matriz extracelular de células eucariotas o anticuerpos.

Otra realización particular preferida proporciona un método para la obtención del biomaterial para sutura, que comprende la modificación genética de la población celular de elección, previamente a la expansión de dicha población celular.

Un cuarto aspecto comprende el uso del biomaterial para sutura de la invención en terapia.

Una realización particular preferida comprende el uso del biomaterial para sutura en la aproximación de los bordes tisulares, que incluye pero no se limita a su aplicación terapéutica en hemostasis, transplante de órganos, cirugía del tracto gastrointestinal, cirugía del tracto urogenital, cirugía del tracto respiratorio, cirugía ocular, cirugía vascular, cirugía plástica y reparadora, cirugía en tejido muscular, en tejido epitelial, en tejido nervioso, así como en reparación de tendones, tejido óseo y tejido cartilaginoso.

Una realización particular más preferida de la invención comprende el uso de las suturas recubiertas de células madre de origen mesodérmico preferiblemente autólogas en los casos en que la reacción inflamatoria local generada por el material de sutura pueda perjudicar los resultados de la intervención quirúrgica.

Una realización particular todavía más preferida comprende el uso del biomaterial para sutura en la aproximación de los bordes tisulares en toda actividad quirúrgica donde sea deseable una mejora de la capacidad de cicatrización local.

Una realización particular aún más preferida comprende el uso del biomaterial para sutura en la aproximación de los bordes tisulares en anastomosis intestinales.

Otra realización particular preferida comprende el uso del biomaterial para sutura en la sujeción de prótesis, como por ejemplo válvulas cardíacas o válvulas neuroquirúrgicas.

Otra realización particular de la invención, comprende el uso de cualquier material protésico (o artefacto) usado en medicina que se implante en el cuerpo humano con los que frecuentemente haya problemas de biocompatibilidad, como por ejemplo válvulas implantes y prótesis quirúrgicas, que haya sido recubierto de células.

Descripción de las figuras

15

Las figuras 1a-1e muestran una fotomicrografía de contraste de fases, en modo visible, de los distintos fragmentos de hilos de sutura usados como material de soporte en el Ejemplo 1. Donde la figura 1a muestra el tipo de hilo absorbible vicryl (Ethicon) ref. V460; la figura 1b muestra el tipo de hilo absorbible monocryl (Ethicon) ref. Y3110; la figura 1c muestra el tipo de hilo absorbible Dexon II (USS-DG) Ref. 9819-41; la figura 1d muestra el tipo de hilo absorbible Safil quick (B/Braun) Ref. 0046030 y la figura 1e muestra el tipo de hilo no absorbible Ethilon (Ethicon) Ref. W1621.

Las figuras 2a-2e ilustran mediante una fotomicrografía de contraste de fases, en modo ultravioleta, el grado de recubrimiento celular alcanzado en los fragmentos de hilos de sutura usados en el Ejemplo 1, tras una semana de incubación. Donde la figura 2a muestra el tipo de hilo absorbible vicryl (Ethicon) ref. V460; la figura 2b muestra el tipo de hilo absorbible monocryl (Ethicon) ref. Y3110; la figura 2c muestra el tipo de hilo absorbible Dexon II (USS-DG) Ref. 9819-41; la figura 2d muestra el tipo de hilo absorbible Safil quick (B/Braun) Ref. 0046030 y la figura 2e muestra el tipo de hilo no absorbible Ethilon (Ethicon) Ref. W1621.

Las figuras 3a-3b ilustran el aspecto general que presentaba la cavidad abdominal de las ratas tras ser laparotomizadas en el cuarto día postoperatorio. Una comparación del aspecto general (inflamación, adherencias generales,..) nos permiten ya diferenciar dos patrones en la evolución de la cicatrización de la sutura anastomótica.

La figura 3a muestra una fotografía de una de las ratas (nº1) pertenecientes al grupo A (cirugía realizada con el biomaterial para sutura de la invención). La figura 3b muestra una fotografía de una de las ratas (nº3) pertenecientes al grupo B (cirugía realizada con hilos Vicryl® 4/0).

5 Las figuras 4a-4b corresponden a una fotografía del segmento cólico que contenía la anastomosis una vez introducido un catéter por el extremo proximal, antes de proceder a la determinación de la presión de ruptura. La figura 4a muestra una fotografía del segmento cólico de una de las ratas (nº1) pertenecientes al grupo A (cirugía realizada con el biomaterial para sutura de la invención). La figura 4b muestra
10 una fotografía del segmento cólico de una de las ratas (nº3) pertenecientes al grupo B (cirugía realizada con hilos Vicryl® 4/0). Con el objetivo de facilitar la comprensión del escalado de las imágenes y poder comparar el grado de inflamación que presenta el segmento cólico resecaado en las figuras 4a y 4b, se ha tomado como referencia la longitud de una porción del catéter, cuyo tamaño real son 7 mm, y se ha indicado
15 mediante una marca, usada como escala de referencia, en la parte inferior de las figuras.

La figura 5 muestra un diagrama que ilustra la variación de la resistencia física de una sutura cólica estándar ante los incrementos de presión intraluminal, en función del tiempo transcurrido desde su realización. Así, se ha observado que tras las primeras horas de postoperatorio se produce un descenso en la resistencia, detectándose los
20 valores más bajos entre el tercer y cuarto día del postoperatorio.

Descripción detallada de modos de realización

La invención proporciona un biomaterial para sutura que comprende un material
25 de soporte para sutura, preferentemente un hilo de sutura, y una población celular recubriendo dicho material de soporte. Esta población celular de recubrimiento se caracteriza porque presenta capacidad proliferativa y/o de diferenciación.

En una realización particular, la invención proporciona un biomaterial de sutura
30 que comprende un hilo de sutura unido a una aguja por uno de sus extremos como material de soporte y como población celular de recubrimiento células madre adultas autólogas derivadas de lipoaspirado.

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar, pero no limitan la presente invención.

EJEMPLO 1: Recubrimiento de hilos de sutura con células madre adultas humanas derivadas de tejido adiposo

El objetivo del presente experimento ha sido estudiar la capacidad de adhesión de un determinado tipo celular a diferentes tipos de hilos de sutura, que actúan como material de soporte del biomaterial para sutura de la presente invención.

1.1. Materiales

Se utilizaron cinco tipos diferentes de hilo de sutura, de igual grosor 3-0 (2 Ph .Eur.). Todos ellos de origen sintético (Tabla I).

Tabla I

Nº. Nombre	Naturaleza	Marca	Referencia
1. VICRYL	Polyglactin 910. Trenzado. Violeta. Sutura absorbible	ETHICON	V460
2. DEXON II	Acido poliglicólico. Trenzado. Verde. Sutura absorbible	USS-DG	9819-41
3. MONOCRYL	Poliglecaprone 25. Monofilamento. Violeta. Sutura absorbible	ETHICON	Y3110
4. SAFILQUICK	Acido poliglicólico. Trenzado. Blanco. Sutura absorbible	B/BRAUN	0046030
5. ETHILON	Polyamide 6. Monofilamento. Azul. Sutura no absorbible	ETHICON	W1621

Como población celular de recubrimiento se utilizaron células madre adultas derivadas de lipoaspirados (CMDLs) humanas, adherentes, que habían sido previamente transducidas con vectores retrovirales que codifican Cop-GFP, proteína fluorescente verde, utilizados como gen marcador.

5 1.1.1. Aislamiento de CMDLs

El tejido adiposo fue obtenido mediante liposucción. Se introdujo una cánula de extremo romo en el espacio subcutáneo gracias a una pequeña incisión periumbilical (menos de 0.5cm de diámetro). Se realizó la succión, deslizando la cánula a través del compartimiento de tejido adiposo situado bajo la pared abdominal, ayudando así, a la
10 disrupción mecánica del tejido adiposo. Con el objetivo de minimizar la pérdida de sangre, se inyectó solución salina y epinefrina, como agente vasoconstrictor. Mediante este método se obtuvieron, 80-100 ml de lipoaspirado crudo de cada paciente.

Se procedió al lavado del lipoaspirado con solución salina tamponada con fosfato (PBS). A continuación, se realizó la disrupción del tejido adiposo mediante
15 digestión de la matriz extracelular con colagenasa tipo II en solución salina (5mg/ml) a 37° durante 30 minutos para liberar la fracción celular. Se inactivó la colagenasa por adición de un volumen equivalente de medio DMEM, con un 10% de suero bovino fetal. Dicha suspensión celular se centrifugó a 250 g durante 10 minutos obteniéndose un depósito de células. Dichas células se resuspendieron en medio DMEM, con un 10%
20 de suero bovino fetal. Se añadió NH₄Cl a una concentración final de 0,16 M y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente para inducir la lisis de los eritrocitos presentes. La suspensión fue centrifugada a 250-400 g y se resuspendió en DMEM-10% FBS con 1% ampicilina-estreptomicina. Finalmente, se plaquearon las células, inoculándose 20-30.000 células por cm².

25

1.1.2. Cultivo de CMDLs

Las células se mantuvieron en cultivo durante 20-24 horas a 37°C, en atmósfera con 5% de CO₂. Tras 24 horas de incubación, las placas se lavaron con PBS para eliminar aquellas células que no presentaban adherencia, así como restos celulares.

30

1.1.3. Transfección de CMDLs adherentes con el gen marcador Cop-GFP

Transfección de las CMDLs que presentaban características de adherencia mediante transducción con sobrenadantes que contenían partículas retrovirales,

RetroFect®, pseudotipadas con VSV-G (glicoproteína de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular), que codifican el gen marcador Cop-GFP. Cop-GFP es una proteína verde fluorescente de copépodo (*Pontellina plumata*) y permite la fácil identificación y selección de las células infectadas por fluorescencia directa. Dicha proteína fluorescente no entra en el núcleo celular. Esto constituye una ventaja, ya que las células que están expresando la proteína Cop-GFP pueden ser fácilmente distinguidas de partículas fluorescentes interferentes.

El método utilizado en la transducción de las CMDLs adherentes consistió en:

10

1. Se añadió polibreno (adyuvante para la transducción retroviral) al sobrenadante retroviral a una concentración final de polibreno de 8 µg/ml.
2. Se cambió el medio de las células diana y se reemplazó por las partículas retrovirales, usando aproximadamente 106 µl de sobrenadante retroviral (aditivos incluidos) por cada cm² de superficie.
3. Para infectar las células se utilizó un método de transducción dinámico. Se centrifugaron las células a 1000 g durante 60 minutos a 37°C en presencia del sobrenadante retroviral.
4. Se retiró el sobrenadante y se añadió medio de cultivo fresco DMEM completo (DMEM-10% FBS con 1% ampicilina-estreptomomicina). Las células transducidas se cultivaron durante 48-72 horas en dicho medio de cultivo.
5. Las células se despegaron de las placas de cultivo con una mezcla de tripsina-EDTA.
6. Se analizó una alícuota mediante citometría de flujo, el resto de células se pasaron a otro recipiente de cultivo para expandirlas.

15

20

25

1.2. Ensayo de adhesión de las células a los hilos de sutura

Como material de soporte, se ensayaron cinco tipos de hilos de sutura distintos. Se cortaron fragmentos de aproximadamente 1 cm de longitud, introduciéndose dos fragmentos de hilo por pocillo, en placas de cultivo de 24 pocillos. Las figuras 1a-1e muestran una fotomicrografía de contraste de fases, en modo visible, de los distintos tipos de hilos de sutura usados como material de soporte.

30

1. Se añadieron 0,5 ml de medio de cultivo DMEM completo, en cada uno de los pocillos, para humedecer los hilos y averiguar si los hilos iban a permanecer sumergidos en el medio de cultivo o flotarían. Los hilos ensayados no flotaron o tras forzar su inmersión permanecieron en el fondo de los pocillos.
5
2. Se preparó una suspensión de células CMDL a una concentración de 50.000 cels/ml y se añadió 1 ml de esta suspensión en cada pocillo.
3. Las placas de cultivo en que se habían depositado los hilos, fueron cultivadas en presencia de la suspensión celular en atmósfera con 5% CO₂ a 37°C, durante 20-24 horas.
10
4. Se observó al microscopio el grado de recubrimiento celular de los hilos alcanzado tras 20-24 horas de incubación, en modo visible y en modo de fluorescencia.

En modo visible no es posible detectar las células sobre los hilos pero si permitió detectar la presencia de células muy dispersas en el fondo del pocillo. Mientras que en modo fluorescencia, gracias a la expresión de la proteína Cop-GFP en las células CMDL transfectadas, se observaron algunas células fluorescentes individuales sobre los hilos, aunque en número muy escaso.

15
5. Se observó al microscopio el grado de recubrimiento celular de los hilos alcanzado 48 horas de incubación, en modo visible y en modo de fluorescencia. No se observaron cambios significativos en la cobertura de los hilos, respecto a las 24 horas de incubación. Se trasladaron los hilos a pocillos con nuevo medio de cultivo.
20
- A partir de este momento, el medio de cultivo fue cambiado cada 2-3 días según calendario.
25
6. Se observó al microscopio el grado de recubrimiento celular de los hilos alcanzado a las 72 horas de incubación, en modo visible y en modo de fluorescencia. Se pudieron observar y fotografiar grupos de células sobre algunos de los hilos ensayados, incluso se pudo diferenciar las células
30

individuales al distinguirse el núcleo de las mismas ya que la proteína Cop-GFP no se expresa en el núcleo de la célula.

7. Tras 1 semana de incubación de las células CMDL transducidas con la proteína Cop-GFP en presencia de los hilos, se observó un aumento en el grado de recubrimiento celular de la superficie de los hilos gracias a las células generadas por división a partir de aquellas que inicialmente se adherieron a los hilos. Las figuras 2a-2e ilustran mediante una fotomicrografía de contraste de fases, en modo ultravioleta, el grado de recubrimiento celular alcanzado en los fragmentos de hilos de sutura usados, tras una semana de incubación.

EJEMPLO 2: Uso del biomaterial de sutura en anastomosis intestinales

El objetivo de este ensayo ha sido el determinar las características del biomaterial para sutura que proporciona la presente invención y las ventajas que aporta su uso frente a hilos de sutura convencionales, mediante la realización de anastomosis cólicas en ratas.

Tras realizar la anastomosis con el biomaterial para sutura de la invención y paralelamente con hilos no recubiertos de células, utilizados como control negativo, se determinaron una serie de parámetros que permitieron valorar el estado de la lesión anastomótica y comparar los resultados obtenidos con ambos tipos de hilos.

2.1. Intervención quirúrgica

2.1.1. Animales y material de sutura

En la realización de la experiencia se utilizaron 12 ejemplares adultos de ratas BDIX, con un peso comprendido entre 130-260 gramos. Dos de los ejemplares se emplearon para la obtención de células madre de rata del tejido adiposo subdérmico y 10 para el estudio de suturas cólicas. Los hilos recubiertos de células se hicieron siguiendo un protocolo similar al ilustrado en el Ejemplo 1. Las ratas BDIX son singénicas, es decir, son genéticamente idénticas e inmunológicamente compatibles. Cada rata se identificó con un número del 1-10 y a cada una le correspondió un lote de suturas con el mismo número.

La muestra se dividió en dos grupos, en función del material de sutura utilizado en la anastomosis:

- 5 • Grupo A (5 ratas): Anastomosis cólica simple realizada con el biomaterial de sutura de la invención. Concretamente, se utilizaron hilos Vicryl® (Polyglactin 910) 4/0, sutura trenzada absorbible, que habían sido tapizados con células derivadas de tejido adiposo de ratas BDIX. En la preparación del biomaterial de sutura de la invención fue utilizado el mismo protocolo que en el Ejemplo 1.
- 10 • Grupo B (5 ratas): Se considera como grupo control. Anastomosis cólica simple realizada con hilos Vicryl® (Polyglactin 910) 4/0.

El 50% de los lotes de sutura se cultivaron en presencia de células madre (biomaterial para sutura de la invención) y la otra mitad fueron incubadas, en idénticas condiciones, tan sólo en presencia de medio de cultivo. Por tanto, resultaba imposible
15 diferenciar los dos tipos de suturas empleados por su aspecto. Se trata de un estudio ciego puesto que los cirujanos desconocían el tipo de hilo empleado en cada intervención.

2.1.2. Anastomosis cólica simple

20 Las ratas fueron laparotomizadas bajo anestesia general tras 24 horas de ayuno con agua "ad libitum". Se practicó una sección completa del colon en el punto medio del colon transversal, cuidando de no lesionar la vascularización marginal y evitando la hemorragia. A continuación, se realizó una anastomosis de los cabos, termino-terminal, evertida y en un plano, con al menos 6 puntos de sutura. Cada punto se anudó tres
25 veces. Finalizada la anastomosis se reintrodujo el colon en la cavidad abdominal y se cerró la laparotomía con hilo de seda del 0 en dos planos.

2.2. Valoración de la cicatrización

Los animales fueron sacrificados, por decapitación, el cuarto día postoperatorio.
30 Con el animal en asistolia se procedió a la apertura del abdomen y se valoraron la dehiscencia, dilatación, obstrucción, adherencias generales, dificultad en la separación de las adherencias generales y determinación de estructuras adheridas.

Criterios de valoración de las variables a estudio:

1. *Dehiscencia clínica (De)*: Existencia de contenido cólico libre en la cavidad peritoneal.
2. *Dilatación (Di)*: Se considera positiva cuando el diámetro del colon transversal pre-anastomótico era al menos dos veces superior al diámetro del colon transversal post-anastomótico.
3. *Obstrucción (Ob)*: Ausencia de contenido fecal en el colon distal a la anastomosis.
4. *Adherencias generales (AG)*: Se realiza una medida basada en una escala de valoración cualitativa del número de adherencias de la cavidad peritoneal (Ellis H., 1962; Verreet PR *et al.*, 1992). Se establecieron 4 niveles o grados: 0 = No hay adherencias, 1 = Adherencias muy localizadas, 2 = Adherencias loco-regionales, 3 = Adherencias difusas
5. *Separación de las adherencias generales (Se)*. Lisis por tracción:
Se establecieron 3 niveles: 1 = Fácil, la mayoría de las adherencias podían separarse con una tracción suave, 2 = Moderado, la mayoría de las adherencias se podían separar mediante un instrumento romo, 3 = Difícil, la mayoría de las adherencias precisaron un instrumento punzante para ser separadas.
6. *Estructuras adheridas (EA)*: Se valora qué estructuras anatómicas se habían adherido a la circunferencia anastomótica. Se establecieron 4 categorías: 1 = epiploon, 2 = intestino delgado, 3 = colon, 4 = otras localizaciones

La medición de la resistencia a la presión intraluminal se puede expresar como presión de ruptura, es decir, la presión a la que se produce la disrupción de una anastomosis sometida a presión intraluminal creciente, o bien como tensión de ruptura, que expresa la tensión circular a la que está sometida la pared en el momento de la ruptura.

2.2.1. Medida de la presión de ruptura (PR)

Mediante una bomba de infusión conectada a un sistema de medición de presiones se determina la presión a la que se produce el escape por la línea anastomótica (presión de ruptura).

Una vez resecado el segmento cólico que contenía la anastomosis, se procedió al cierre del extremo distal con sutura de seda 1/0. El extremo proximal fue ligado de forma similar una vez introducido un catéter de perfusión intravenosa. En las figuras 4a-4b se muestra una fotografía del segmento cólico que contenía la anastomosis tras ser introducido un catéter por el extremo proximal. El catéter es conectado a una llave de tres pasos o sistema en "T", en la que una de las ramas se dirige a la cápsula de un transductor de presión que registra las variaciones de presión y envía estas señales a un sistema de poligrafía digital. Estos datos son finalmente enviados a un ordenador para proceder a su análisis y almacenamiento.

La otra rama se conecta a una bomba de perfusión cargada con suero fisiológico coloreado con azul de metileno para observar el momento y el punto de ruptura.

2.2.2. Tensión de ruptura de la pared (TR)

El cálculo de la tensión de ruptura está determinado por la medición de la circunferencia anastomótica tras la fijación de la pieza en formol al 20% durante cuatro días. Se practicó un corte longitudinal con bisturí del segmento de colon que contenía la anastomosis y mediante una regla graduada, se midió la circunferencia interna (cn) de la pieza en décimas de milímetro. El conocer la longitud de la circunferencia interna nos permite calcular el radio interno del colon (r), aplicando la siguiente fórmula: $cn=2\pi r$

20

La tensión de ruptura (TR) es función de la presión de ruptura (PR) y del radio interno del colon (r) en virtud de la Ley de Laplace. Se obtiene aplicando la siguiente fórmula:

$$TR = 1.33 \times 10^3 \times PR \times r \quad (TR = \text{dinas/ cm; PR} = \text{mmHg; } r = \text{cm})$$

25

2.3. Resultados

Se realizó una anastomosis cólica en 10 ratas adultas BDIX que se distribuyeron en dos grupos A y B, en función del material de sutura utilizado. Dos de los animales intervenidos con el objeto de valorar la cicatrización de la anastomosis, uno correspondiente a cada uno de los grupos, tuvieron que ser excluidos del estudio. En uno de los animales, durante la cirugía se produjo un desgarro de mesosigma, mientras que en el otro se produjo un desgarro de la anastomosis al introducir el catéter en el extremo cólico-distal en el momento de medir la presión de ruptura.

30

En la Tabla II se presentan los resultados obtenidos para las diferentes variables analizadas en la valoración de la sutura anastomótica.

Tabla II

ANIMAL	De	INFLAMACIÓN		ADHERENCIAS			RESISTENCIA		
		Di	Ob	AG	Se	EA	PR (mmHg)	r (cm)	TR x10 ³ (dinas/cm)
1	NO	NO	NO	2	1	1,3	43,1	0,38	21,78
4	NO	SI	NO	2	1	1,2	41,73	0,35	19,43
6	NO	SI	NO	2	1	2,4	63,1	0,22	18,46
7 ^a	NO	SI	NO	3	3	1,2	36,7	0,27	13,18
MEDIA							46,16	0,31	19,03
2	NO	SI	SI	3	3	1,2,3,4	52	0,24	16,60
3	NO	SI	NO	2	3	1,2,3	50,47	0,35	23,49
5 ^b	NO	NO	NO	3	3	1,2,3	52,06	0,25	17,31
10	NO	SI	SI	3	3	1,2,4	24,4	0,24	7,79
MEDIA							44,73	0,27	16,06

5 **Grupo A:** 1,4,6,7

T_{student}

0,879

0.624

Grupo B: 2,3,5,10

OBSERVACIONES:

a ciego invertido

b 7 puntos sutura

10 ABREVIATURAS:

Dehiscencia clínica (De)

Adherencias generales (AG)

Presión de ruptura (PR)

Dilatación (Di)

Separación de las adherencias generales (Se)

Radio (r)

Obstrucción (Ob)

Estructuras adheridas (EA)

Tensión de ruptura (TR)

15

2.4. Discusión

La valoración de la cicatrización de la herida anastomótica se realizó el cuarto día postoperatorio, por considerarlo el día crítico en la evolución de las anastomosis cólicas (Ravo, 1988).

20

Tras la apertura de la cavidad abdominal, los cuadrantes fueron retraídos exponiendo de forma global toda la cavidad peritoneal. Las figuras 3a-3b ilustran el

aspecto general que presentaba la cavidad abdominal de las ratas tras ser laparotomizadas en el cuarto día postoperatorio. Sorprendentemente, una valoración del aspecto general (inflamación, adherencias generales,..) es suficiente para diferenciar dos patrones en la evolución de la cicatrización de la sutura anastomótica. Así, los animales en que se habían utilizado hilos de sutura convencionales (Grupo B) presentan un mayor grado de inflamación general y un mayor número de estructuras adheridas al intestino, que aquellos animales en que la cirugía se realizó utilizando el biomaterial para sutura de la invención (Grupo A).

En primer lugar, se determinó que el manejo quirúrgico del biomaterial para sutura de la invención es idéntico al de los hilos convencionales. La presencia de células tapizando los hilos no altera la manejabilidad de las suturas.

Con el objetivo de valorar la cicatrización de la sutura anastomótica, se determinaron de una serie de variables: dehiscencia, dilatación, obstrucción, adherencias generales, separación de adherencias, estructuras adheridas, presión de ruptura y tensión de ruptura.

1. *Dehiscencia*: En ninguno de los grupos se observó presencia de material fecal en la cavidad peritoneal. Para el tipo de rata utilizado, la técnica quirúrgica así como el material de sutura empleados eran adecuados.
2. *Dilatación*: En ambos grupos se observó dilatación del colon pre-anastomótico en un 75% de los casos.
3. *Obstrucción*: Aunque la dilatación del segmento pre-anastomótico era similar en ambos grupos, la repercusión clínica fue distinta. Así, el 100% de los animales del grupo tratado quirúrgicamente con el biomaterial de la invención (Grupo A) no presentaban obstrucción intestinal, mientras que había obstrucción en el 50% de los animales tratados con suturas convencionales (Grupo B). La no existencia de obstrucción cólica implica una serie de ventajas clínicas en cuanto a rapidez en la recuperación del paciente y reducción de complicaciones postoperatorias.
4. *Adherencias Generales*: Una valoración cualitativa del número de adherencias de la cavidad peritoneal muestra que en el Grupo A un 75% de los casos presenta adherencias loco-regionales, mientras que en el Grupo B un 75% de los casos presentan adherencias difusas.

5. *Separación de adherencias:* En el Grupo A un 75% de los casos pertenecen al nivel 1, las adherencias se separan fácilmente. Un único caso (25%) se ha clasificado en el nivel 3, siendo necesario para su separación el uso de instrumentos de corte. No obstante, este animal presentaba como particularidad que la colocación del ciego había sido invertida durante la intervención. Por el contrario, el 100% de los casos del Grupo B pertenecen al nivel 3.
6. *Estructuras adheridas:* En el Grupo A, el epiplon se encuentra adherido en un 75% de los casos y el 100% de los casos presentan adherencias a dos estructuras distintas. El 100% de los casos del Grupo B presentan adherido el epiplon y el intestino delgado. En un 75% de los casos se observan adherencias a tres estructuras distintas y el caso restante presenta adherencias a cuatro estructuras distintas.

15 Las adherencias tienen importancia patológica debido a que alteran la fisiología normal de las superficies serosas. Sorprendentemente, los animales pertenecientes al Grupo A presentan un patrón de adherencias más regionales, más fáciles de separar y un menor número de estructuras adheridas, lo cual implica una reducción de las complicaciones originadas por las adherencias intraperitoneales: obstrucción intestinal, dolor crónico abdominal e infertilidad. La utilización de un material extraño en la cavidad abdominal produce un nivel de adherencias elevado (Ellis H, 1962, Zarapico et al, 1972). La disminución de las adherencias observada en el ensayo podría ser debida a que el biomaterial de la invención no es reconocido como algo extraño por el organismo.

25

La utilización de un método físico para la valoración de la cicatrización de la anastomosis, tiene por objeto que ésta sea lo más global posible, ya que el uso de otros métodos como pueden ser los bioquímicos o histológicos, nos dan una visión parcial de estos procesos a nivel de la anastomosis. La resistencia física de una sutura cólica ante los incrementos de presión intraluminal, varía según el tiempo transcurrido desde su realización. Así, se ha observado que tras las primeras horas de postoperatorio se produce un descenso en la resistencia, detectándose los valores más bajos entre el tercer y cuarto día del postoperatorio. A partir de este momento se produce un rápido aumento

de la resistencia, alcanzándose al séptimo día del postoperatorio, valores cercanos a los de la resistencia de la pared cólica en estado fisiológico (figura 5). Esta inflexión de la curva de fuerza anastomótica alrededor del cuarto día postoperatorio está íntimamente relacionada con los procesos celulares y químicos que tienen lugar a lo largo del proceso inflamatorio y reparador.

En el Grupo A, la resistencia media de las anastomosis, calculada como presión de ruptura, es de 46,1575 mmHg, siendo superior a la resistencia media encontrada en el Grupo B: 44,7325 mmHg.

10

La medición de la resistencia a la presión intraluminal mediante determinación de la presión de ruptura, presenta el inconveniente de no tener en cuenta el diámetro de ese segmento del colon. Si medimos la presión de ruptura sin tener en cuenta el diámetro del segmento del colon, dejamos a un lado la Ley de Laplace ($T = P \times r$) y no consideramos el hecho de que para una misma presión de ruptura la tensión que soporta la pared es mayor en la zona de mayor radio (Asencio F. *et al*, 1989). Al realizar el cálculo de la tensión de ruptura media, comprobamos que en el Grupo A la pared intestinal soporta una tensión de ruptura media de $19,03 \times 10^3$ dinas/cm, siendo superior a la resistencia media encontrada en el Grupo B: $16,06 \times 10^3$ dinas/cm.

20

Así, a pesar de que no existen diferencias estadísticamente significativas a nivel de presión de ruptura, el cálculo de la tensión de ruptura corroboró los resultados obtenidos: la sutura realizada con el biomaterial de la invención presenta una mayor resistencia a la presión que la realizada con hilos de sutura convencionales. Además, el valor máximo de resistencia a la ruptura correspondió a uno de los animales pertenecientes al grupo A y el valor mínimo quedó incluido en el grupo B. Una mayor resistencia a la ruptura de la sutura anastomótica implica un menor riesgo de dehiscencia, separación de una parte de la anastomosis, la cuál es una complicación severa y constituye una de las principales causas de muerte en el postoperatorio de cirugía cólica.

30

2.5. Conclusión

Una valoración del aspecto general (inflamación, adherencias generales,..) es suficiente para diferenciar dos patrones en la evolución de la cicatrización de la sutura anastomótica. Así, los animales en que se utilizaron hilos de sutura convencionales (Grupo B) presentaban un mayor grado de inflamación general y un mayor nivel de adherencias (adherencias más difusas, un mayor número de estructuras adheridas y un mayor grado de dificultad en su separación) que aquellos animales en que la cirugía se realizó utilizando el biomaterial para sutura de la invención (Grupo A). El uso del material de sutura de la invención induce una menor respuesta inflamatoria dando lugar a una reducción de las complicaciones post-anastomóticas características.

Asimismo, en aquellos animales que han sido intervenidos con el biomaterial para sutura de la invención (Grupo A) se observa una mayor resistencia de las suturas cólicas a la presión intraluminal creciente y por tanto un menor riesgo de dehiscencia.

En el cuarto día post-operatorio, establecido como día crítico en la evolución de las anastomosis cólicas, podemos concluir que las suturas anastomóticas realizadas con el biomaterial para sutura de la invención presentan una mejor evolución respecto aquellas que han sido realizadas con hilos de sutura convencionales. El biomaterial para sutura de la invención no se limita a acercar los extremos tisulares, sino que contribuye de manera biológicamente activa a la cicatrización del tejido acelerando el proceso de reparación.

EJEMPLO 3: Uso del biomaterial de sutura en anastomosis intestinales. **Valoración de la cicatrización a medio plazo**

Una vez estudiadas las características del biomaterial para sutura que proporciona la presente invención y las ventajas que aporta su uso frente a hilos de sutura convencionales, en la realización de anastomosis cólicas en ratas a corto plazo (cuarto día postoperatorio), se realizó un segundo ensayo con el objetivo de determinar si se mantienen los dos patrones a nivel de inflamación y adherencias observados en el cuarto día post-anastomosis.

Para poder valorar la evolución de la cicatrización a medio plazo, se estudió la evolución de la herida anastomótica en animales sacrificados una y dos semanas después de la intervención. Al igual que en el Ejemplo 2, tras realizar la anastomosis con el biomaterial para sutura de la invención y paralelamente con hilos de sutura

convencionales, utilizados como control negativo, se determinaron una serie de parámetros que permitieron valorar el estado de la lesión anastomótica y comparar los resultados obtenidos en los dos grupos de estudio.

5 3.1. Intervención quirúrgica

En la realización de la experiencia se utilizaron 20 ejemplares adultos de ratas BDIX, con un peso comprendido entre 130-260 gramos. Se realizaron dos ensayos, sacrificándose los animales la primera y segunda semana post-anastomosis. En cada ensayo se identificó a cada una de las ratas con un número del 1-10, correspondiéndole un lote de suturas con el mismo número.

Los animales empleados se dividieron en dos grupos, en función del material de sutura utilizado en la anastomosis:

- Grupo A (5 ratas): Anastomosis cólica simple realizada con el biomaterial de sutura de la invención. Concretamente, se utilizaron hilos Vicryl® (Polyglactin 910) 4/0, sutura trenzada absorbible, que habían sido tapizados con células derivadas de tejido adiposo de ratas BDIX. En la preparación del biomaterial de sutura de la invención fue utilizado el mismo protocolo que en el Ejemplo 1.
- Grupo B (5 ratas): Se considera como grupo control. Anastomosis cólica simple realizada con hilos Vicryl® (Polyglactin 910) 4/0.

Al igual que en el Ejemplo 2, el 50% de los lotes de sutura se cultivaron en presencia de células madre (biomaterial para sutura de la invención) y la otra mitad fueron incubadas, en idénticas condiciones, tan sólo en presencia de medio de cultivo, resultando imposible diferenciar los dos tipos de suturas empleados por su aspecto. Asimismo, las ratas fueron intervenidas quirúrgicamente mediante realización de una anastomosis intestinal, según se describe en el Ejemplo 2.

3.2. Valoración de la cicatrización

Con el objetivo de realizar un seguimiento de la evolución de la cicatrización a medio plazo, se valoró la cicatrización de la herida anastomótica en los animales sacrificados una y dos semanas tras la intervención. Las variables estudiadas son definidas en el Ejemplo 2.

3.3. Resultados

Se realizó una anastomosis cólica en 20 ratas adultas BDIX que se distribuyeron en dos grupos de individuos los cuales fueron analizados a diferentes tiempos tras la intervención. A su vez, cada grupo fue dividido en dos subgrupos A y B, en función del material de sutura utilizado.

En la Tabla IIIa se presentan los resultados obtenidos para las diferentes variables analizadas en la valoración de la sutura anastomótica, una semana después de la intervención quirúrgica.

Tabla IIIa

ANIMAL	INFLAMACIÓN			ADHERENCIAS			RESISTENCIA		
	De	Di	Ob	AG	Se	EA	PR (mmHg)	r (cm)	TR x10 ³ (dinas/cm)
2	NO	NO	NO	2	2	1,2	124	0,366	60,36
3	NO	NO	NO	2	2	1,2	126,4	0,302	50,77
6	NO	NO	NO	2	2	1,2	138,54	0,398	73,33
7	NO	NO	NO	2	3	1,2	120,73	0,318	51,06
10	NO	NO	NO	2	2	1,2	108	0,366	52,57
MEDIA							123,53	0,35	57,62
1	NO	NO	NO	3	3	1,2,4	119,7	0,429	68,08
4	NO	NO	NO	3	3	1,2	121,82	0,27	43,74
5	NO	NO	NO	2	3	1,2,3	92,78	0,35	43,16
8	NO	NO	NO	3	3	1,2	124	0,398	65,63
9	NO	NO	NO	3	3	1,2,3,4	119,68	0,35	55,71
MEDIA							115,60	0,359	55,26

15 **Grupo A:** 2,3,6,7,10

T_{student}

0,325

0,738

Grupo B: 1,4,5,8,9

ABREVIATURAS:

Dehiscencia clínica (De)

Adherencias generales (AG)

Presión de ruptura (PR)

20 Dilatación (Di)

Separación de las adherencias generales (Se)

Radio (r)

Obstrucción (Ob)

Estructuras adheridas (EA)

Tensión de ruptura (TR)

En la Tabla IIIb se presentan los resultados obtenidos para las diferentes variables analizadas en la valoración de la sutura anastomótica, dos semanas después de la intervención quirúrgica.

5

Tabla IIIb

ANIMAL	INFLAMACIÓN			ADHERENCIAS			RESISTENCIA		
	De	Di	Ob	AG	Se	EA	PR (mmHg)	r (cm)	TRx10 ³ (dinas/cm)
1	NO	NO	NO	1	2	1	114,57	0,286	43,58
4	NO	SI	NO	2	3	1,2	80,2	0,366	39,04
6	NO	SI	NO	1	3	1	87,62	0,222	25,97
7	NO	NO	NO	1	3	1	105,6	0,302	42,41
9	NO	SI	NO	2	3	1,2	94,21	0,366	45,86
MEDIA							96,44	0,308	39,37
2	NO	SI	NO	2	3	1,2	101,21	0,191	25,71
3	NO	SI	NO	2	3	1,2	87,62	0,127	14,8
5	NO	NO	NO	1	2	1	101,36	0,318	42,87
8	NO	NO	NO	2	3	1,2	110,63	0,318	46,79
10	NO	SI	NO	3	3	1,4	107,92	0,27	38,75
MEDIA							101,75	0,245	33,78

Grupo A: 1,4,6,7,9

T_{student} 0,490

0,441

10 Grupo B: 2,3,5,8,10

ABREVIATURAS:

Dehiscencia clínica (De)

Adherencias generales (AG)

Presión de ruptura (PR)

Dilatación (Di)

Separación de las adherencias generales (Se)

Radio (r)

15 Obstrucción (Ob)

Estructuras adheridas (EA)

Tensión de ruptura (TR)

3.4. Discusión

Con el objetivo de conocer si existen diferencias en la evolución de la cicatrización a medio plazo entre los dos grupos de estudio, se efectuó una valoración de la cicatrización de la herida anastomótica transcurridas una y dos semanas desde la intervención quirúrgica. Para ello, se determinación una serie de variables: dehiscencia, dilatación, obstrucción, adherencias generales, separación de adherencias, estructuras adheridas, presión de ruptura y tensión de ruptura.

20

3.4.1. Análisis la 1ª semana post-anastomosis:

- 5 1. *Dehiscencia:* En ninguno de los grupos de estudio se observó presencia de materia fecal en la cavidad peritoneal. Los resultados observados indican que la técnica quirúrgica, así como el material de sutura empleados, fueron adecuados.
2. *Dilatación:* En ambos grupos de estudio, ninguno de los animales presentó dilatación del colon pre-anastomótico.
- 10 3. *Obstrucción:* De acuerdo con la ausencia de dilatación observada, tanto el grupo de animales tratado quirúrgicamente con el biomaterial de sutura de la invención (Grupo A) como el grupo en el que se utilizaron suturas convencionales (Grupo B) no presentaron obstrucción intestinal.
- 15 4. *Adherencias Generales:* Una valoración cualitativa del número de adherencias de la cavidad peritoneal muestra que en el Grupo A un 100% de los casos presentaba adherencias loco-regionales, mientras que en el Grupo B, un 80% presentaba adherencias difusas.
- 20 5. *Separación de adherencias:* En el Grupo A un 80% de los casos se clasificaron en un nivel 2 (moderado), las adherencias son separadas mediante un instrumento romo. Por el contrario, el 100% de los casos del Grupo B fueron clasificados en un nivel 3, ya que para la separación de las adherencias fue necesario el uso de un instrumento punzante.
- 25 6. *Estructuras adheridas:* En todos los animales pertenecientes al Grupo A se encontraban adheridos el epiplon y el intestino delgado (dos estructuras anatómicas distintas). Los animales del Grupo B, a pesar de obtenerse resultados heterogéneos, de manera general presentaban un mayor número de estructuras adheridas: el 100% de los animales presentaban adherido el epiplon y el intestino delgado, en un 40% de los casos se observaron adherencias a tres estructuras distintas y uno de los animales (20%) presentó adherencias a cuatro estructuras distintas.
- 30 7. *Presión de ruptura:* En el Grupo A, la resistencia media de las anastomosis, calculada como presión de ruptura, es de 123,53 mmHg, siendo superior a la presión de ruptura media encontrada en el Grupo B: 115,60 mmHg.
8. *Tensión de ruptura:* La tensión de ruptura expresa la tensión circular a la que está sometida la pared intestinal en el momento de la ruptura. En el Grupo A

la pared intestinal soporta una tensión de ruptura media de $57,62 \times 10^3$ dinas/cm, siendo superior a la media del Grupo B: $55,26 \times 10^3$ dinas/cm.

No existen diferencias entre los dos grupos de estudio en cuanto a la valoración de la inflamación de manera general. Sin embargo, en el aspecto adherencial (adherencias generales, separación de adherencias, estructuras adheridas) se conserva el patrón observado el cuarto día post-anastomosis. Así pues, se observa que los animales pertenecientes al Grupo A, tratados con el biomaterial para sutura de la invención, presentan adherencias más localizadas, más fáciles de separar y con un menor número de estructuras adheridas.

En cuanto a la resistencia de la línea anastomótica, pesar de que no existen diferencias estadísticamente significativas, se mantiene una mayor resistencia a una presión intraluminal creciente, tanto a nivel de tensión de ruptura como de presión de ruptura, en aquellas suturas realizadas con el biomaterial de la invención. Además, el valor máximo de resistencia a la ruptura, al igual que en el ensayo realizado el cuarto día post-anastomosis, correspondió a uno de los animales pertenecientes al grupo A y el valor mínimo quedó incluido en el grupo B.

3.4.2. Análisis la 2ª semana post-anastomosis:

1. *Dehiscencia:* En el 100% de los animales de ambos grupos, había ausencia de material cólico libre en la cavidad peritoneal. Los resultados observados indican que la técnica quirúrgica, así como el material de sutura empleados, fueron adecuados.

2. *Dilatación:* El 60% de los animales de ambos grupos presentaron dilatación del colon pre-anastomótico. No observándose diferencias en función del material de sutura utilizado.

3. *Obstrucción:* Tanto en el grupo de animales tratado quirúrgicamente con el biomaterial de sutura de la invención (Grupo A) como en los que se utilizaron suturas convencionales (Grupo B) se obtuvo un 100% de resultados libres de obstrucción intestinal.

4. *Adherencias Generales:* Una valoración cualitativa del número de adherencias de la cavidad peritoneal muestra que en el grupo A un 60% eran muy localizadas

y el 40% restante loco-regionales. En el grupo B un 60% eran loco-regionales, un 20% muy localizadas y el 20% restante difusas.

5 5. *Separación de Adherencias*: Tanto en los animales tratados con el biomaterial de sutura de la invención como en aquellos tratados con suturas convencionales, la intensidad en la adherencia a otros órganos ha sido elevada, presentando en ambos grupos un 80% de los casos un nivel 3 de separación (difícil), siendo necesaria la utilización de un instrumento punzante para su separación.

10 6. *Estructuras Adheridas*: En el Grupo A, el 100% de los animales presentaron adherencias en el epiplon, mostrando además un 40% de los casos adherencias en el intestino delgado. En el Grupo B el 100% de los casos presentaron adherencias en el epiplon. Además, un 80% de los casos presentaba adherencias a dos estructuras distintas, un 60% de los cuales en el intestino delgado.

15 7. *Presión de ruptura*: En el Grupo A, la resistencia media de las anastomosis, calculada como presión de ruptura, es de 96,44 mmHg, siendo inferior a la presión de ruptura media encontrada en el Grupo B: 101,75 mmHg.

8. *Tensión de ruptura*: En el Grupo A la pared intestinal soporta una tensión de ruptura media de $39,37 \times 10^3$ dinas/cm, siendo superior a la media del Grupo B: $33,78 \times 10^3$ dinas/cm.

20 No existen diferencias entre los dos grupos de estudio en cuanto a la valoración de la inflamación de manera general. En relación con el grado de adherencias observado, el uso del biomaterial para sutura de la invención da lugar a adherencias más localizadas, con menor número de estructuras anatómicas adheridas y con un grado similar de dificultad en su separación, respecto al uso de suturas convencionales.

25 En cuanto a la resistencia de la sutura anastomótica, al analizar la tensión de ruptura observamos que la tensión circular a la que está sometida la pared intestinal en el momento de la ruptura es mayor en el grupo de animales que han sido intervenidos utilizando el biomaterial de sutura de la invención (Grupo A).

30 Se mantiene una mejor evolución de la herida anastomótica en aquellos animales que han sido intervenidos utilizando el biomaterial para sutura de la invención. No obstante, tanto a nivel de patrón de inflamación como en el patrón adherencial, las diferencias observadas en los animales sacrificados dos semanas después de la

intervención son más leves que las observadas el cuarto día post-operatorio y la primera semana post-anastomosis.

3.5. Conclusión

5 Al valorar la evolución de la cicatrización en el cuarto día post-anastomosis y en semanas posteriores, observamos que el biomaterial para sutura de la invención presenta ventajas importantes (menor grado de inflamación general, menor nivel de adherencias y una mayor resistencia a la presión intraluminal) frente a las suturas estándar. El biomaterial para sutura de la invención contribuye de manera biológicamente activa en
10 la cicatrización de la herida anastomótica, siendo las diferencias respecto al uso de suturas convencionales más evidente en el cuarto día post-operatorio, considerado crítico en la evolución de la herida anastomótica. Dichas ventajas se mantienen a medio plazo, a pesar de ser de menos significativas.

15 **Referencias**

- Aronson SB, Mc Master PR, Moore TE Jr, Coon MA. Toxicity of the cyanoacrylates. Arch Ophthalmol. 1970 Sep; 84(3):342-9.
- Asencio Arana F., Martinez Soriano F., Fenollosa Vazquez R. Aproximación a los estudios de las anastomosis intestinales experimentales. Métodos bioquímicos, físicos y microangiográficos. Cir Esp 1989; 46:805-810
- Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, Leboy PS, Owen ME. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. J Cell Sci. 1992 Jun; 102 (Pt 2):341-51.
- 25 ▪ Caplan AI. Mesenchymal stem cells. J Orthop Res. 1991 Sep; 9(5):641-50.
- De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. Cells Tissues Organs. 2003; 174(3):101-9.
- 30 ▪ Ellis H. The aetiology of postoperative abdominal adhesions. An experimental study. Br J Surg 1962; 50:10-16
- Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes. Int Rev Cytol. 1976; 47:327-59.

- Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone*. 1992; 13(1):81-8.
- Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res*. 1998 Jan 10; 238(1):265-72.
- 5 ▪ Milde LN. An anaphylactic reaction to fibrin glue. *Anesth Analg*. 1989 Nov; 69(5):684-6.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 Apr 2; 284(5411):143-7.
- 10 ▪ Ravo B: Colorectal anastomotic healing and intracolonic bypass procedure. *Surg Clin North Am* 1988; 68:1267-1294
- Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*. 2003 Feb 15; 75(3):389-97.
- 15 ▪ Verreet PR, Fakir C, Ohmann C, Roër HD. Preventing recurrent postoperative adhesions: An experimental study in rats. *Eur Surg Res* 1992; 21: 267-273.
- Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve*. 1995 Dec; 20 18(12):1417-26.
- Zarapico Romero M, Saez López de Rueda F. La asociación fibrino-desoxirribonucleasa en la profilaxis de las adherencias peritoneales postoperativas. *Rev Fac Med Sevilla* 1972; 20: 347-362.
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002 Dec; 13(12):4279-95.
- 25 ▪ Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001 Apr; 7(2):211-28

REIVINDICACIONES

1. Biomaterial para sutura que comprende:
 - a. un material de soporte.
 - b. una población celular con capacidad proliferativa y/o de diferenciación recubriendo dicho material de soporte.
2. Biomaterial, según la reivindicación 1, en el que el material de soporte son hilos absorbibles o no absorbibles.
3. Biomaterial, según las reivindicaciones 1-2, en el que el material de soporte son hilos de origen natural o de origen sintético.
4. Biomaterial, según las reivindicaciones 1-3, en el que el material de soporte son hilos de estructura monofilamento o de estructura multifilamento.
5. Biomaterial, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el material de soporte es un hilo de sutura unido a una aguja.
6. Biomaterial, según la reivindicación 1, en el que el material de soporte son grapas.
7. Biomaterial, según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la población celular de recubrimiento comprende células madre.
8. Biomaterial, según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la población celular de recubrimiento comprende células madre adultas multipotentes.
9. Biomaterial, según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la población celular de recubrimiento comprende células madre adultas multipotentes de origen mesodérmico.

10. Biomaterial, según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en el que la población celular de recubrimiento comprende células madre adultas multipotentes derivadas de tejido adiposo.
11. Biomaterial, según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la población celular de recubrimiento del material de soporte comprende células que expresan, al menos, una característica propia de una célula especializada.
12. Biomaterial, según la reivindicación 11, en el que la población celular de recubrimiento del material de soporte es seleccionada entre células que expresen al menos una característica propia de célula epitelial o de célula endotelial o de adipocito o de miocito o de condrocito o de osteocito o de neurona o de astrocito o de oligodendrocito o de hepatocito o de célula pancreática.
13. Biomaterial, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la población celular de recubrimiento del material de soporte es una población celular heterogénea.
14. Biomaterial, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la población celular de recubrimiento del material de soporte comprende células genéticamente modificadas.
15. Biomaterial, según la reivindicación 14, en el que la población celular de recubrimiento del material de soporte comprende células modificadas con un gen que codifica una proteína implicada en reparación tisular.
16. Biomaterial, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la población celular de recubrimiento del material de soporte comprende una población celular autóloga o alogénica o xenogénica o bien una combinación de éstas.
17. Biomaterial, según la reivindicación 16, en el que la población celular de recubrimiento del material de soporte comprende una población celular autóloga.

18. Biomaterial, según la reivindicación 16, en el que la población celular de recubrimiento del material de soporte comprende una población celular alogénica.
19. Método de preparación de un biomaterial, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende:
- Expansión de la población celular de elección.
 - Inmersión del material de sutura en un medio de cultivo adecuado para dicha población celular.
 - Inoculación de una suspensión de la población celular pre-cultivada sobre el material de sutura.
 - Cultivo de la preparación anterior en condiciones adecuadas.
 - Aislar el material de sutura que presente un recubrimiento celular adecuado.
20. Método de preparación de un biomaterial para sutura, según la reivindicación anterior, en el que la población celular de recubrimiento se une al material de soporte mediante adhesión.
21. Método de preparación de un biomaterial, según la reivindicación 19, que comprende además un recubrimiento previo de la superficie del material de soporte que facilite la adherencia de la población celular.
22. Método de preparación de un biomaterial, según la reivindicación 21, en el que dicho material de recubrimiento es seleccionado del grupo constituido por: péptidos, antígenos proteicos, azúcares y lípidos.
23. Método de preparación de un biomaterial, según la reivindicación 21, en el que dicho material de recubrimiento son proteínas de matriz extracelular de células eucariotas o anticuerpos.
24. Biomaterial para sutura, según las reivindicaciones 1-18, para su uso en terapia.

25. Biomaterial para sutura, según las reivindicaciones 1-18, para su uso en la aproximación de los bordes tisulares en sutura de heridas, accidentales o quirúrgicas, y en reparación de tejidos.
26. Biomaterial para sutura, según las reivindicaciones 1-18, para su uso en hemostasis, transplante de órganos, cirugía del tracto gastrointestinal, cirugía del tracto urogenital, cirugía del tracto respiratorio, cirugía ocular, cirugía vascular, cirugía plástica, cirugía en tejido muscular, en tejido epitelial, en tejido nervioso, así como en reparación de tendones, tejido óseo y tejido cartilaginoso.
27. Biomaterial para sutura, según las reivindicaciones 1-15, que comprende una población celular de recubrimiento del material de soporte autóloga para su uso en los casos en que la reacción inflamatoria local generada pueda perjudicar los resultados de la intervención quirúrgica.
28. Uso del biomaterial para sutura, según cualquiera de las reivindicaciones 1-18, para su uso en la elaboración de un material útil en la aproximación de los bordes tisulares en sutura de heridas, accidentales o quirúrgicas, y en reparación de tejidos.
29. Uso del biomaterial para sutura, según cualquiera de las reivindicaciones 1-18, para su uso en la elaboración de un material útil en la aproximación de los bordes tisulares en anastomosis intestinales.
30. Uso del biomaterial para sutura, según cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en la sujeción de prótesis.
31. Uso de células con capacidad proliferativa y/o de diferenciación como población celular de recubrimiento de un material de soporte para sutura.
32. Uso según la reivindicación 31, caracterizado porque la población celular de recubrimiento son células madre adultas pluripotentes.

33. Uso según la reivindicación 31, caracterizado porque la población celular de recubrimiento son células madre adultas multipotentes.
34. Uso según la reivindicación 31, caracterizado porque la población celular de recubrimiento son células madre adultas multipotentes de origen mesodérmico.
35. Uso según la reivindicación 31, caracterizado porque la población celular de recubrimiento son células madre adultas multipotentes derivadas de tejido adiposo.
36. Uso según la reivindicación 31 caracterizada porque la población celular de recubrimiento es de origen autólogo, alogénico, xenogénico o bien combinaciones de éstas.

FIGURA 1

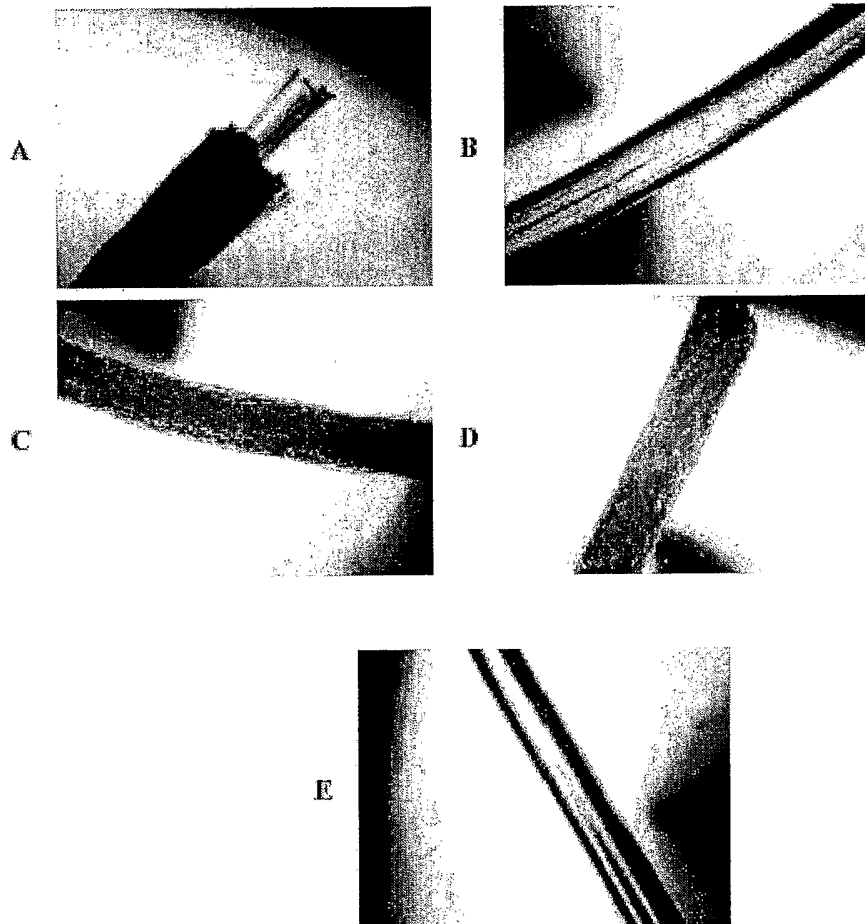


FIGURA 2

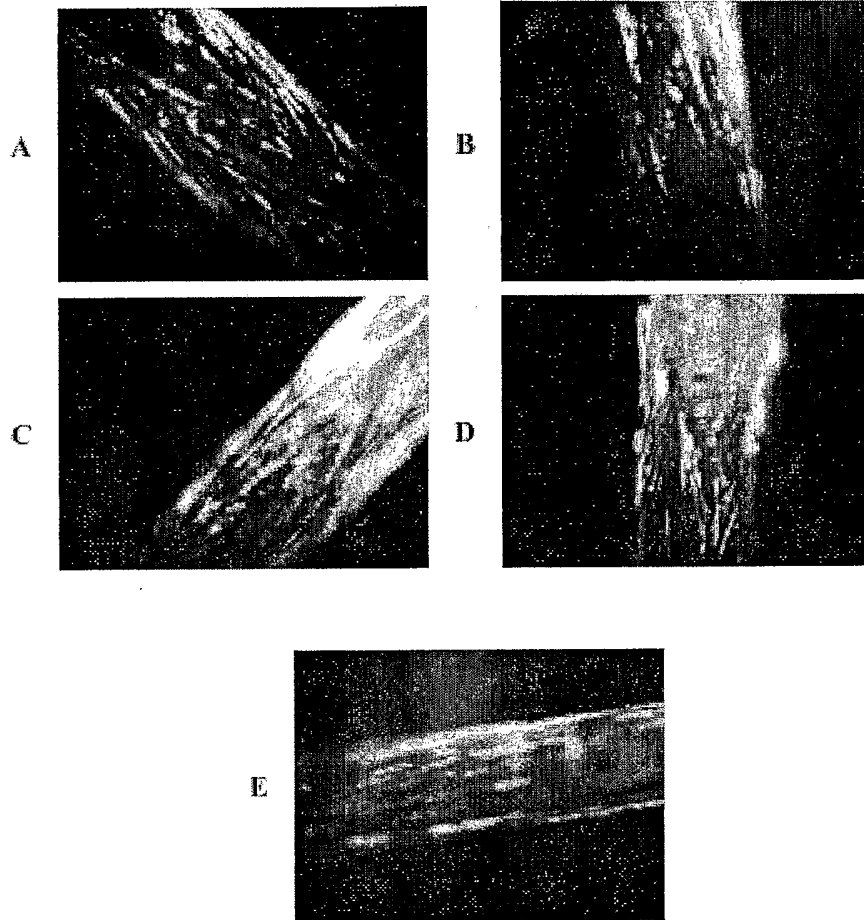


FIGURA 3

A

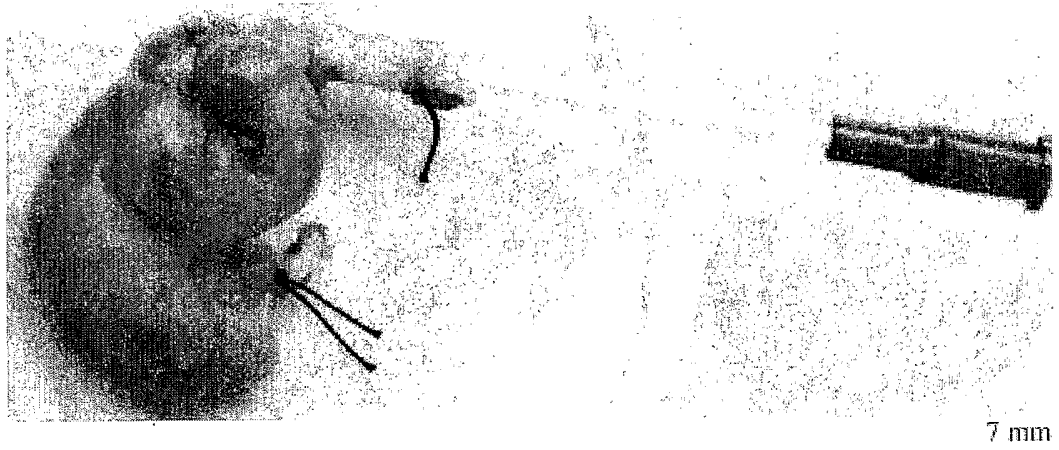


B



FIGURA 4

A



B

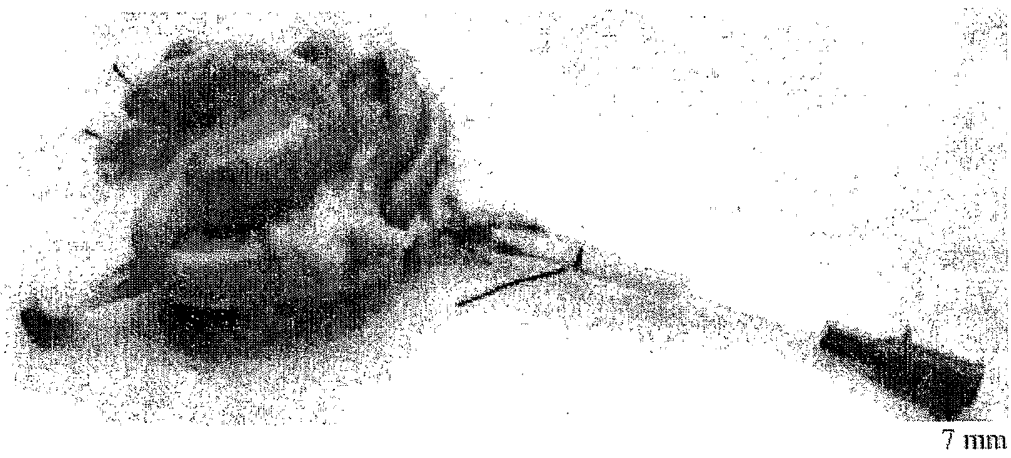
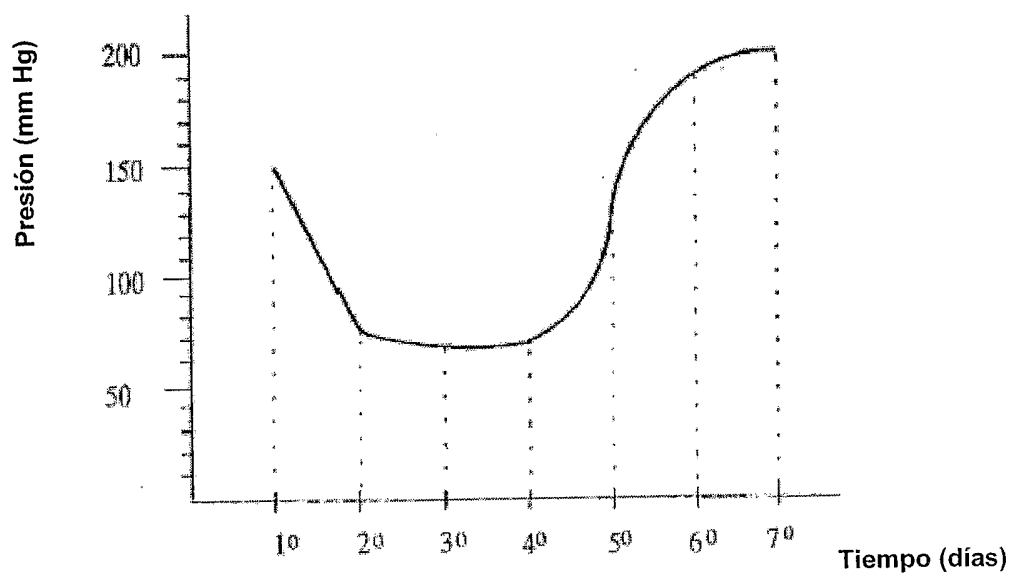


FIGURA 5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ ES 2005/000468

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
A61L 17/00 (2006.01) C12N 5/08 (2006.01)
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 A61L17, C12N5

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 EPODOC, WPI, CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VAN EIJK, F. ET AL., "Tissue Engineering of Ligaments: A Comparison of Bone Marrow Stromal Cells, Anterior Cruciate Ligament, and Skin Fibroblasts as Cell Source." Tissue Engineering MAY 2004, 10(5/6), 893-903.	1-36
X	AWAD, HANI A. ET AL., "Repair of patellar tendon injuries using a cell-collagen composite." Journal of Orthopaedic Research (2003), 21(3), 420-431.	1-36
X	US 5855619 A (CAPLAN ET AL.) 5 January 1999	1-36
P,X	WO 05062857 A2 (THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY) 14 July 2005	1-36
X	KIM, DONG-IK ET AL., "Comparative study of seeding and culture methods to vascular smooth muscle cells on biodegradable scaffold." Journal of Microbiology and Biotechnology, (August 2004) Volume 14, Number 4, pp. 707-714.	1-36

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
 "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 24 February 2006 (24.02.06)	Date of mailing of the international search report 2 March 2006 (02.03.06)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ S.P.T.O.	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/ ES 2005/000468

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO2005062857A A	14.07.2005	NONE	-----
-----	-----	-----	-----
US 5855619 A	05.01.1999	WO 9533421 A	14.12.1995
		CA 2192103 A	14.12.1995
		AU 2696895 A	04.01.1996
		AU 686823 B	12.02.1998
		JP 10505250 T	26.05.1998
		EP 0952792 A	03.11.1999
		US 6174333 B	16.01.2001
		AT 247933 T	15.09.2003
		DE 69531638 D	02.10.2003
		DK 952792 T	08.12.2003
		PT 952792 T	31.12.2003
		ES 2206509 T	16.05.2004
		DE 69531638 T	17.06.2004
-----	-----	-----	-----

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ ES 2005/000468

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
A61L17, C12N5

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, WPI, CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	VAN EIJK, F. ET AL., "Tissue Engineering of Ligaments: A Comparison of Bone Marrow Stromal Cells, Anterior Cruciate Ligament, and Skin Fibroblasts as Cell Source." Tissue Engineering MAY 2004, 10(5/6), 893-903.	1-36
X	AWAD, HANI A. ET AL., "Repair of patellar tendon injuries using a cell-collagen composite." Journal of Orthopaedic Research (2003), 21(3), 420-431.	1-36
X	US 5855619 A (CAPLAN ET AL.) 5 enero 1999	1-36
P,X	WO 05062857 A2 (THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY) 14 julio 2005	1-36
X	KIM, DONG-IK ET AL., "Comparative study of seeding and culture methods to vascular smooth muscle cells on biodegradable scaffold." Journal of Microbiology and Biotechnology, (August 2004) Volume 14, Number 4, pp. 707-714.	1-36

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

24 Febrero 2006 (24.02.2006)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

02 MARZO 2006 (02-03-2006)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

O.E.P.M.

Funcionario autorizado

M. Hernández Cuéllar

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.

Nº de fax 34 91 3495304

Nº de teléfono + 34 91 3495545

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº
PCT/ ES 2005/000468

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO2005062857A A	14.07.2005	NINGUNO	-----
US 5855619 A	05.01.1999	WO 9533421 A CA 2192103 A AU 2696895 A AU 686823 B JP 10505250 T EP 0952792 A US 6174333 B AT 247933 T DE 69531638 D DK 952792 T PT 952792 T ES 2206509 T DE 69531638 T	14.12.1995 14.12.1995 04.01.1996 12.02.1998 26.05.1998 03.11.1999 16.01.2001 15.09.2003 02.10.2003 08.12.2003 31.12.2003 16.05.2004 17.06.2004

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61L 17/00 (2006.01)

C12N 5/08 (2006.01)