(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 358 057**

(51) Int. Cl.:
C12N 5/077 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **07789590 .2**
(96) Fecha de presentación : **26.07.2007**
(97) Número de publicación de la solicitud: **2046947**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **15.04.2009**

(54) Título: **Procedimiento para la producción de células madre multipotentes.**

(30) Prioridad: **28.07.2006 IT MI06A1498**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI: **05.05.2011**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente: **05.05.2011**

(73) Titular/es: **METAPONTUM AGROBIOS S.R.L.**
S.S. Jonica 106 Km. 448.2
75010 Metaponto, Metera, IT

(72) Inventor/es: **Cifarelli, Rosa, Anna;**
Cellini, Francesco;
Di Liddo, Rosa y
Parnigotto, Pier, Paolo

(74) Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 358 057 T3

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

La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento para la producción de células madre multipotentes.

La investigación sobre células madre multipotentes y totipotentes (Conrad C., *et al*., 2005) ha abierto posibilidades nuevas e interesantes de aplicación para la terapia celular y la ingeniería de tejidos. Sin embargo, ha de definirse todavía cuál es la fuente de células madre más adecuada para su aplicación.

La utilización de poblaciones de células embrionarias (ES) ha estimulado recientemente un interés científico creciente en el campo médico. Aunque estas células se caracterizan por una alta capacidad de replicación, pluripotencialidad de diferenciación y expansión a largo plazo *in vitro*, su utilización terapéutica, sin embargo, está limitada debido a los numerosos problemas éticos implicados (Kiatpongsan S. *et al*., 2006).

La considerable evidencia experimental ha demostrado que pueden identificarse fuentes alternativas de células madre en adultos; aunque éstas presentan únicamente capacidad de diferenciación en un número limitado de tipos celulares, no presentan problemas éticos. Entre las fuentes de células madre adultas están la médula ósea (Saulnier N. *et al*., 2005), el epitelio seminífero de la gónada masculina (Cyranoski D. *et al*., 2006), epitelios (Janes SM, *et al*., 2002), sangre periférica, sangre de cordón umbilical (Saulnier N. *et al*., 2005) y tejido adiposo (Strem BM, *et al*., 2005).

Sin embargo, las células madre adultas, no resultan disponibles fácilmente ya que están limitadas en cuanto a su número; además no pueden cultivarse *in vitro* durante un periodo prolongado ya que, tras diversas divisiones celulares, tienden a perder su multipotencialidad.

Junto con estas fuentes fisiológicas de células madre, se ha añadido recientemente otra fuente muy prometedora, que puede obtenerse mediante la modificación del programa genético de células diferenciadas (F. Santos, *et al*., 2002; A.J. Peter, *et al*., 2001; R. Wolf, *et al*., 2001; J.C. Gutierrez, *et al*., 2000; T.H. Bestor, 2000; C. Stewart, *et al*., 1982; R.D. Palmiter, *et al*., 1982; D. Biniszkiewicz, *et al*., 2002; M.F. Chan, *et al*., 2001; M. Okano, *et al*., 1999). Los investigadores Wilmut y Campbell (Shiels PG, *et al*., 1999; Eyestone WH, *et al*., 1999) y posteriormente Yanagimachi y colaboradores (Wakayama T, *et al*., 2001) establecieron claramente, utilizando modelos de animales, que el núcleo de células somáticas completamente diferenciadas puede reprogramarse si se transfiere al citoplasma de un óvulo. Los mecanismos y las moléculas implicados en este proceso de desprogramación y reprogramación del genoma de células somáticas aún no se han aclarado completamente. Sin embargo, es evidente que durante este proceso se descondensa la cromatina, se desestabiliza la estructura del nucleosoma y se disocian las proteínas reguladoras de la fibra de ADN influyendo así en la expresión génica (T. Haaf, *et al*., 2000).

Otras observaciones experimentales han demostrado que, en las primeras fases del desarrollo embrionario, existen numerosas modificaciones de metilación epigenéticas de los residuos de citosina con respecto al genoma, produciéndose como resultado un cambio en el fenotipo celular e implicación de la célula hacia una línea de diferenciación específica (F. Santos, *et al*., 2002; A.J. Peter, *et al*., 2001; R. Wolf, *et al*., 2001; J.C. Gutierrez, *et al*., 2000; Jetsche A. *et al*., 2006; Szyf M, *et al*., 1989; Keshhet I, *et al*., 1985).

A este respecto, se desarrolló la idea de que se puede reprogramar cualquier célula completamente diferenciada modificando parcial o completamente el estado de metilación de su genoma, por medio del tratamiento con factores específicos.

Taranger y colaboradores (Taranger CK, *et al*., 2005), de hecho, han demostrado que las células epiteliales 293T pueden diferenciarse hasta que se expresan marcadores típicos del estado embrionario tras 1 hora de tratamiento con el extracto de células NCCIT, aisladas de teratoma. El análisis cuantitativo de la expresión génica y el estudio en micromatrices efectuados en las colonias mantenidas en un cultivo durante 23 pases reveló que la transición al fenotipo celular pluripotente implica una estimulación dinámica de cientos de genes típicos de las células NCCIT (entre los que se encuentran OCT4 (Ovitt CE, *et al*., 1998), SOX2 (M.V. Zappone, *et al*., 2000), NANOG (K. Mitsui, *et al*., 2003)) y una disminución de la expresión en los genes que caracterizan la células 293T y en los indicadores de diferenciación genéricos tales como, por ejemplo, lamininas de tipo A.

Además, la evidencia experimental ha demostrado que un agente desmetilante, la 5'-aza-2'-citidina (5-AzaC), un producto análogo a la citosina, puede provocar una desmetilación exhaustiva de los residuos de 5-metilcitosina (M. Vlahovic, *et al*., 1999) y reducir la actividad de la ADN metiltransferasa (Tsuji-Takayama K, *et al*., 2004; Karpf AR, *et al*., 1999; U. Aapola, *et al*., 2001; X. Cheng, 1995; L.R. Silverman, *et al*., 1993; Simonsson, S., y Gurdon, 2004; Flasza, M., *et al*., 2003).

Se han identificado 4 enzimas de ADN citosina metiltransferasa, Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b y Dnmt31 en células embrionarias (Shiels PG, *et al*., 1999; Eyestone WH, *et al*., 1999; Wakayama T, *et al*.,

2001).

La Dnmt1 es la principal enzima que mantiene el estado de metilación durante la replicación del ADN. Su inactivación en modelos murinos provocó la pérdida de la huella genómica y condujo a la mortalidad precoz del embrión. La Dnmt3a, la Dnmt3b y la Dnmt31, que principalmente catalizan la metilación *de novo*, son extremadamente activas en células madre embrionarias y promueven su diferenciación *in vitro*.

Utilizada como un agente quimioterápico eficaz en el tratamiento de la leucemia (Yang AS, *et al*., 2006), la 5-AzaC ha demostrado ser un medio experimental útil para estudiar la metilación del ADN en la diferenciación celular y en mecanismos de activación génica (J.G. Herman, *et al*., 1994; K. Yoshiura, *et al*., 1995; Y.L. Ottaviano, *et al*., 1994; C.M. Bender, *et al*., 1998). La 5-AzaC, por ejemplo, ha demostrado intervenir en la inducción de la diferenciación en sentido miogénico de las células madre multipotentes aisladas del cordón umbilical, la médula ósea y el tejido adiposo (Lin Y, *et al*., 2006). Otros estudios proporcionan asimismo datos relacionados con su actividad moduladora sobre el desarrollo embrionario con respecto a los efectos de proliferación y diferenciación. (Tsuji-Takayama K, *et al*., 2004). Además, los cuerpos embrioides diferenciados *in vitro* y tratados durante 6 horas con 5-AzaC (1 μM) reestablecieron el proceso de crecimiento de colonias típico de las células madre y la sensibilidad al factor inhibidor de leucemia (LIF).

La acción desmetilante de la 5-azacitidina, con una restauración consiguiente de la multipotencialidad celular, se demuestra en gran medida y se verifica también en plantas, monocotiledóneas (trigo) y dicotiledóneas (tomates), en el documento W02005003344.

Lin Tsai Ming *et al*. (Stem cells and development, vol. 14, n.º1, febrero de 2005, páginas 92-102) dan a conocer un procedimiento para obtener células madre multipotenciales a partir de tejido adiposo utilizando un medio con antioxidantes y calcio reducido. Las células así obtenidas pueden diferenciarse en adipocitos, osteoblastos, condrocitos y mioblastos y expresar el marcador de células madre embrionarias Oct-4. El documento citado no da a conocer un procedimiento por el que se obtienen células madre multipotenciales tras el tratamiento con 5-AzaC.

El análisis morfológico/funcional y el estudio de la expresión génica concluyen que 5-AzaC revierte el estado diferenciado de las células embrionarias, organizadas en cuerpos embrioides, lo que puede atribuirse fenotípicamente a células madre pluripotentes no diferenciadas que expresan marcadores típicos tales como SSEA-1, fosfatasa alcalina, Oct4, Nanog y SOX2.

Otros numerosos estudios han descrito la reactivación en células somáticas mediante el tratamiento con 5-AzaC de genes silenciados tales como VHL, E-cadherina, receptor de estrógeno y p16. Los genes de la familia STAT, que presentan un papel importante en el mantenimiento del estado no diferenciado de las células madre embrionarias (ES) y su capacidad de autorreplicación mediante la transducción de la señal de LIF, son probablemente también la diana de agentes desmetilantes. Karpf y colaboradores (Karpf AR., *et al*., 1999) han observado que los genes STAT silenciados en las células tumorales del colon se reactivan mediante el tratamiento con 5-AzaC, acompañado por el reestablecimiento de la sensibilidad celular con el interferón alfa (INF-α).

Por tanto, parecería que el tratamiento con 5'-aza-2'-citidina puede presentar un efecto sobre la proliferación, diferenciación o desdiferenciación de diferentes tipos celulares, que pertenecen a organismos animales o vegetales y en diversas fases del desarrollo (embrionario, adulto, etc.).

A partir de lo descrito anteriormente, resulta evidentemente necesario disponer de un procedimiento para la producción de células madre multipotentes partiendo de una fuente de células autólogas inagotable, disponible fácilmente y sin problemas éticos. También es deseable que el procedimiento sea fácilmente controlable, repetible y sobre todo, que no conduzca a la transformación neoplásica de las propias células.

Se ha descubierto en el contexto de la presente invención un procedimiento para la producción de células madre multipotentes que satisface todas las demandas descritas anteriormente y que supera las desventajas de los procedimientos ya conocidos en el estado de la técnica. De hecho, se han descubierto fuentes alternativas ventajosas de células somáticas muy diferenciadas destinadas a la medicina generativa, que, sometidas a un tratamiento desmetilante a concentraciones adecuadas, representan una fuente inagotable de células madre autólogas multipotentes fácilmente disponibles. La reprogramación de esta fuente de células somáticas representa una solución importante para el problema de la falta de donantes de médula ósea y no presenta ningún problema de una naturaleza ética.

Por tanto, un objetivo de la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de células madre multipotentes partiendo de adipocitos o preadipocitos que comprende la fase de tratamiento desmetilante de dichas células con 5'-aza-2'-citidina a una concentración comprendida entre 0,1 μM y 175 μM hasta la aparición de marcadores típicos del estado embrionario multipotente y no diferenciado y/o la reducción en la expresión de los marcadores de fase de diferenciación tardía.

Según una forma de realización preferida del procedimiento según la invención, cuando se lleva a cabo dicho procedimiento partiendo de preadipocitos, comprende las siguientes fases:

a) inducción de la diferenciación de los preadipocitos en células maduras mediante:

i) cultivo de los preadipocitos hasta alcanzar la confluencia máxima;

ii) tratamiento con factores de diferenciación;

iii) cultivo en el medio de mantenimiento sin agentes de inducción de la diferenciación hasta que se verifique la expresión de leptina o GLUT-4;

b) tratamiento desmetilante de las células adiposas maduras muy diferenciadas con 5'-aza-2'-citidina a una concentración comprendida entre 0,1 μM y 175 μM hasta la aparición de marcadores típicos del estado embrionario no diferenciado y/o la reducción en la expresión de los marcadores de fase de diferenciación tardía.

En una forma de realización particularmente preferida de la invención, dichas células somáticas adultas muy diferenciadas de mamíferos o sus precursores son adipocitos o preadipocitos y dichos marcadores de fase de diferenciación tardía son marcadores adipogénicos, preferentemente seleccionados de leptina y GLUT-4 o una combinación de los mismos.

Según una forma de realización preferida del procedimiento según la invención, cuando se lleva a cabo dicho procedimiento partiendo de preadipocitos, comprende las siguientes fases:

a) inducción de la diferenciación de dichos preadipocitos en adipocitos maduros mediante:

i) cultivo de los precursores de adipocitos hasta alcanzar la confluencia máxima;

ii) tratamiento con factores de diferenciación, seleccionados preferentemente de entre insulina, isobutilmetilxantina, dexametasona, indometacina o una combinación de los mismos;

iii) cultivo en un medio de mantenimiento sin agentes de inducción adipogénicos hasta que se verifique la expresión de leptina o GLUT-4;

b) tratamiento desmetilante de las células adiposas maduras muy diferenciadas con 5'-aza-2'-citidina a una concentración comprendida entre 0,1 μM y 175 μM hasta la aparición de marcadores típicos del estado embrionario no diferenciado y/o la reducción en la expresión de los marcadores adipogénicos de fase de diferenciación tardía, preferentemente seleccionados de entre leptina y GLUT-4 o una combinación de los mismos. Dichos marcadores típicos del estado embrionario no diferenciado se seleccionan preferentemente de entre OCT4, SOX2, NANOG, SSEA-1 y fosfatasa alcalina o una combinación de los mismos.

La concentración de la utilización de 5'-aza-2'-citidina se selecciona preferentemente de entre 100 μM, 125 μM, 150 μM y 175 μM.

En una forma de realización preferida, dicho cultivo en un medio de mantenimiento sin agentes de inducción adipogénicos de fase iii) presenta una duración de 7-10 días.

Según una forma de realización preferida, el procedimiento de la invención comprende asimismo una fase de inducción de la diferenciación en un sentido osteogénico (dexametasona 100 nM, β-glicerofosfato 10 mM, ácido ascórbico-2-fosfato 0,05 mM), condrogénico (ácido ascórbico-2-fosfato 2,0 x 10^{-4} M, TGFβ1 1 ng/ml) o miogénico (suero bovino fetal (FBS) al 20%, suero de caballo al 10%, extracto de embrión de pollo al 1%).

Finalmente, la invención se refiere a la utilización de 5'-aza-2'-citidina a una concentración comprendida entre 0,1 μM y 175 μM para la inducción de la formación de células madre multipotentes partiendo de adipocitos o preadipocitos. La concentración de 5'-aza-2'-citidina se selecciona preferentemente de entre 100 μM, 125 μM, 150 μM y 175 μM.

A continuación se describe la presente invención a título ilustrativo no limitativo, a partir de sus formas de realización preferidas, haciendo referencia particular a las figuras de los dibujos adjuntos, en los que:

la figura 1 representa el resultado de una PCR semicuantitativa en relación con la expresión del gen Ob (leptina) de poblaciones de adipocitos tratados con 5-azacitidina 175 μM;

las figuras 2-6 representan imágenes en microscopio de contraste de fases (100x de aumento) de las poblaciones celulares tras 10 días de tratamiento con 5-azacitidina (1 μM, 10 μM, 100 μM,

175 μM) y adipocitos de referencia maduros, respectivamente;

las figuras 7 y 8 representan las imágenes en microscopio de contraste de fases (100x de aumento) de cultivos tratados con 5-azacitidina a concentraciones iguales a 250 μM e inferiores a 0,1 μM, respectivamente.

EJEMPLO 1

Se evaluaron los efectos del agente desmetilante 5-azacitidina (a diferentes concentraciones) sobre la capacidad de las células adiposas maduras de revertir hasta el estado no diferenciado y de reprogramarse, tras estimulación adecuada, en un sentido de diferenciación multilineal (por ejemplo, en un sentido osteogénico, condrogénico y miogénico).

MATERIALES Y MÉTODOS

Desarrollo de un modelo celular adecuado in vitro

Se sembraron líneas celulares embrionarias 3T3-L1 y preadipocitos humanos a una densidad de 5 x 10^3 células/cm^2 y se cultivaron en placas Petri en un medio proliferativo en (DMEM-F12, suero bovino fetal (FCS) al 10%, antibiótico-Fungizone (AF) al 1%) hasta que se alcanzó la confluencia celular máxima. Se obtuvo la inducción de la diferenciación mediante un tratamiento de 48 horas en un medio específico que consistía en DMEM, suero bovino fetal (FBS) al 10%, AF al 1 % y factores de diferenciación específicos (insulina, isobutilmetilxantina, dexametasona, indometacina). Se alcanzó la forma diferenciada madura (fenotipo univacuolar) tras cultivar 7 a 10 días en un medio de mantenimiento, sin agentes inductores adipogénicos. Los estudios inmunofluorescentes verifican la expresión de leptina, una hormona expresada normalmente por los adipocitos en la fase adulta.

Tratamiento con 5-AzaC

Se mantuvieron las células adiposas maduras en un cultivo con DMEM, FBS al 10%, AF al 1% durante dos semanas, con estimulación continua de 5'-azacitidina a concentraciones molares de 0,1 μM, 1 μM, 10 μM, 100 μM, 125 μM, 150 μM, 175 μM, 250 μM. La dosis óptima de 5'-azacitidina comprendida entre 0,1 μM y 175 μM y las concentraciones que son particularmente eficaces son las de entre 100 μM y 175 μM. A dosis ≥ 250 μM el tratamiento desmetilante ya no es adecuado para la producción de células multipotentes partiendo de células muy diferenciadas puesto que se convierte en un tratamiento quimioterápico que induce a las células a apoptosis en vez de revertir hasta el estado no diferenciado tal como se representa en la figura 7 en la que se observa un alto grado apoptótico (tratamiento de cultivos con 5'-azacitidina a una concentración de 250 μM). A dosis ≤ 0,1 μM tal como se muestra en la figura 8, no existe ningún signo de daño celular y/o proliferación celular en las células tratadas.

Expresión de leptina: condiciones experimentales de la reacción de PCR

Con el fin de amplificar el ADNc obtenido de los cultivos tratados con 5-Aza, se utilizó lo siguiente:

- Termociclador-amplificador Eppendorf;
- Cebadores específicos diseñados con la ayuda del programa PrimerQuest (http://biotools.idt.com) y la consulta de la base de datos de nucleótidos (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) y BLAST (Herramienta local básica de búsqueda de alineación, *Basic Local Alignment Search Tool*) (http://www.ncbi. nlm.nih.gov/BLAST/).

Se adquirieron los cebadores de New England Biolabs.

Condiciones de amplificación: 95ºC durante 10 minutos (desnaturalización inicial), 30 ciclos de 95ºC durante 30 segundos (desnaturalización), 52ºC durante 45 segundos (apareamiento), 72ºC durante 45 segundos (extensión), 72ºC durante 10 minutos (extensión final). Se preparó la mezcla de reacción con 1 μl de ADNc, 1 μl de mezcla de dNtP (10 mM), 1,25 μl de disolución de $MgCl_2$ (25 mM), 1,25 μl de tampón 10X, 0,2 μl de Ampli Taq Gold (5U μl) (Applied Biosystem), 1 μl de cebador sentido específico y 1 μl de cebador antisentido (10 μM), 8 μl de H_2O sin ARNasa en un volumen final de 12,5 μl.

RESULTADOS

Análisis morfológico de los cultivos tratados y control por medio de microscopia óptica

En las células tratadas con el agente desmetilante 5-AzaC, los resultados preliminares muestran un cambio en la morfología de la placa; se observa principalmente, de hecho, a concentraciones de 1-10 μM y superiores a 100 μM, que la desaparición progresiva de células globosas, agrupadas en grupos grandes y caracterizadas por una vacuola lipídica voluminosa, se asocia con la aparición de elementos

celulares que presentan una forma más alargada con o sin vacuolas lipídicas distribuidas a nivel citoplasmático. Más adelante en la presente memoria, se proporcionan imágenes en microscopio óptico de poblaciones celulares tras 10 días de tratamiento con 5-AzaC. Se adjuntan imágenes en microscopio de contraste de fases (100x de aumento) de poblaciones de referencia y aquéllas tratadas con 5-azacitidina.

Determinación del crecimiento celular

Se observa la proliferación celular midiendo la 5'-bromo-2'desoxiuridina (BrdU) incorporada en las células adiposas tratadas con 5-azacitidina. Puesto que se conoce en la bibliografía que las células adiposas maduras no presentan capacidad de proliferación, es interesante caracterizar mejor la fracción celular que presenta una morfología fibroblastoide que sólo aparece en las muestras tratadas y no en las muestras de referencia.

Determinación de la apoptosis celular

Con la utilización del kit de detección apoptótica *in situ* TACS Klenow, se observaron fenómenos apoptóticos tanto en las muestras tratadas como en las muestras de referencia de 24 horas, 48 horas, 72 horas tras el tratamiento con 5-azacitidina. La siguiente tabla indica los resultados en relación con las muestras de adipocitos tratadas con 125 μM, 150 μM, 175 μM.

Tabla 1

TIEMPO	REFERENCIA	TRATADAS CON 125 μM	TRATADAS CON 150 μM	TRATADAS CON 175 μM
25 horas	10%	15%	22%	38%
48 horas	12%	15%	28%	41%
72 horas	10%	10%	10%	10%
Pruebas semicuantitativas (PCR) y cuantitativas (RT-PCR)				

Se evaluó la expresión de los marcadores adipogénicos de fase tardía (leptina, GLUT-4), marcadores de fase precoz (PPAR-γ, CEBP-α) y marcadores típicos del estado embrionario no diferenciado (OCT4, SOX2, NANOG, SSEA-1, fosfatasa alcalina) mediante PCR y RT-PCR.

Los resultados preliminares mostraron una reducción en la expresión de los marcadores adipogénicos de fase de diferenciación tardía. La figura 1 representa el resultado de la PCR semicuantitativa en relación con la expresión del gen Ob (leptina) de poblaciones de adipocitos tratadas con 5-azacitidina 175 μM.

BIBLIOGRAFIA

- Conrad C, Huss R. J Surg Res. Abril de 2005; 124(2):201-8.
- Kiatpongsan S, Tannirandorn Y, Virutamasen P. J Med Assoc Thai. Enero de 2006; 89(1):111-7.
- Saulnier N, Di Campli C, Zocco MA, Di Gioacchino G, Novi M, Gasbarrini A. Eur Rev Med Pharmacol Sci. Nov-Dic de 2005; 9(6):315-24.
- Cyranoski D. Nature. 30 de marzo de 2006; 440(7084):586-7.
- Janes SM, Lowell S, Hutter C. J Pathol. Julio de 2002; 197(4):479-91.
- Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH. Keio J Med. Septiembre de 2005; 54 (3):132-41.
- F. Santos, B. Hendrich, W. Reik, W. Dean. Dev. Biol. 2002; 241:172-182.
- A.J. Peter, T. Daiya. Science 2001; 293:1068-1070.
- R. Wolf, W. Dean, J. Walter. Science 2001; 293:1089-1093.
- J.C. Gutierrez, S. Callejas, S. Borniquel, A. Martin-Gonzalez. Int. Microbiol. 2000; 3:139-146.
- T.H. Bestor. Hum. Mol. Genet. 2000; 9:2395-2402.
- C. Stewart, H. Stuhlmann, D. Jahner, R. Jaenisch. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1982; 79:4098-4102.

- R.D. Palmiter, H.Y. Chen, R.L. Brinster. Cell 1982; 29:701-710.
- D. Biniszkiewicz, J. Gribnau, B. Ramsahoye, F. Gaudet, K. Eggan, D. Humpherys, M.A. Mastrangelo, Z. Jun, J. Walter, R. Jaenisch. Mol. Cell. Biol. 2002; 22:2124-2135.
- M.F. Chan, R. van Amerongen, T. Nijjar, E. Cuppen, P.A. Jones, P.W. Laird. Mol. Cell. Biol. 2001; 21:7587-7600.
- M. Okano, D.W. Bell, D.A. Haber, E. Li. Cell 1999; 99:247-257.
- Shiels PG, Kind AJ, Campbell KH. Wilmut I, Waddington D, Colman A, Schnieke AE. Cloning. 1999; 1(2):119-25.
- Eyestone WH, Campbell KH. J Reprod Fertil Supl. 1999; 54:489-97.
- Wakayama T, Yanagimachi R. Mol Reprod Dev. Abril de 2001; 58(4):376-83.
- T. Haaf, M. Schmid. Cytogenet. Cell Genet. 2000; 91:113-123.
- F. Santos, B. Hendrich, W. Reik, W. Dean. Dev. Biol. 2002; 241:172-182.
- A.J. Peter, T. Daiya. Science 2001; 293:1068-1070.
- R. Wolf, W. Dean, J. Walter. Science 2001; 293:1089-1093.
- J.C. Gutierrez, S. Callejas, S. Borniquel, A. Martin-Gonzalez. Int. Microbiol. 2000; 3:139-146.
- Jetsch A. Curr Top Microbiol Immunol. 2006;301:203-25.
- Szyf M, Schimmer BP, Seidman JG. Proc Natl Acad Sci U S A. Septiembre de 1989; 86(18):6853-7.
- Keshhet I, Yisraeli J, Cedar H. Proc Natl Acad Sci U S A. Mayo de 1985; 82(9):2560-4.
- Taranger CK, Noer A, Sorensen AL, Hakelien AM, Boquest AC, Collas P. Mol Biol Cell. 2005; 16(12):5719-35.
- Ovitt CE, Scholer HR. Mol Hum Reprod. Noviembre de 1998; 4(11):1021-31.
- M.V. Zappone, R. Galli, R. Catena, N. Meani, S. De Biasi, E. Mattei, C. Tiveron, A.L. Vescovi, R. Lovell-Badge, S. Ottolenghi. Development 2000; 127:2367-2382.
- K. Mitsui, Y. Tokuzawa, H. Itoh, K. Segawa, M. Murakami, K. Takahashi, M. Maruyama, M. Maeda, S. Yamanaka. Cell 2003; 113:631-642.
- M. Vlahovic, F. Bulic-Jakus, G. Juric-Lekic, A. Fusis, S. Maric, D. Serman. Int. J. Dev. Biol. 1999; 43:843-846.
- Tsuji-Takayama K, Inoue T, Ijiri Y, Otani T, Motoda R, Nakamura S, Orita K. Biochem Biophys Res Commun. 8 de octubre de 2004; 323(1):86-90.
- Karpf AR, Peterson PW, Rawlins JT, Dalley BK, Yang Q, Albertsen H, Jones DA. Proc Natl Acad Sci U S A. Noviembre de 1999; 96(24):14007-12.
- U. Aapola, R. Lyle, K. Krohn, S.E. Antonarakis, P. Peterson. Cytogenet. Cell Genet. 2001;92:122-126.
- X. Cheng. Curr. Opin. Struct. Biol. 1995;5:4-10.
- L.R. Silverman, J.F. Holland, R.S. Weinberg, B.P. Alter, R.B. Davis, R.R. Ellison, E.P. Demakos, C.J. Cornell, R.W. Carey, C. Schiffer, E. Frei III, O.R. McIntypr. Leukemia (Baltimore) 1993; 7:21-29.
- Simonsson, S., y Gurdon. J. Nat. Cell Biol. 2004; 6:984-990.
- Flasza, M., Shering, A. F., Smith, K., Andrews, P. W., Talley, P., y Johnson, P. A. Cloning Stem Cells 2003; 5: 339-354.
- Yang AS, Doshi KD, Choi SW, Mason JB, Mannari RK, Gharybian V, Luna R, Rashid A, Shen L, Estecio MR, Kantarjian HM, Garcia-Manero G, Issa JP. Cancer Res. Mayo de 2006; 66(10):5495-503.
- J.G. Herman, F. Latif, Y. Weng, M.I. Lerman, B. Zbar, S. Liu, D. Samid, D.S. Duan, J.R. Gnarra, W.M. Linehan, S.B. Baylin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994; 919:700-9704.
- K. Yoshiura, Y. Kanai, A. Ochiari, Y. Shimoyama, T. Sugimura, S. Hirohashi. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995; 92: 7416-7419.

- Y.L. Ottaviano, J.P. Issa, F.F. Parl, H.S. Smith, S.B. Baylin, N.E. Davidson. Cancer Res. 1994; 54:2552-2555.
- C.M. Bender, M.M. Pao, P.A. Jones. Cancer Res. 1998; 58:95-101.
- Lin Y, Liu L, Li Z, Qiao J, Wu L, Tang W, Zheng X, Chen X, Yan Z, Tian W. Mol Cell Biochem. 23 de mayo de 2006.
- Tsuji-Takayama K, Inoue T, Ijiri Y, Otani T, Motoda R, Nakamura S, Orita K. Biochem Biophys Res Commun. 8 de octubre de 2004; 323(1):86-90.
- Cellini Francesco, Cifarelli RosaAnna Gallitelli Maria; Mango Teresa; Lauria Giuseppe; Semeraro Lucia. METHOD FOR THE ISOLATION OF EXPRESSED SEQUENCE TAGS IN PLANTS 13.01.2005. Documento WO2005003344.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción de células madre multipotentes partiendo de adipocitos o preadipocitos que comprende la fase de tratamiento desmetilante de dichas células con 5'-aza-2'-citidina a una concentración comprendida entre 0,1 μM y 175 μM hasta la aparición de marcadores típicos del estado embrionario multipotente y no diferenciado y/o la reducción en la expresión de los marcadores adipogénicos de fase de diferenciación tardía.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende las fases siguientes:

a) inducción de la diferenciación de los preadipocitos en adipocitos maduros mediante:

i) cultivo de los preadipocitos hasta alcanzar la confluencia máxima;

ii) tratamiento con factores de diferenciación;

iii) cultivo en un medio de mantenimiento exento de agentes de inducción adipogénicos hasta que se verifique la expresión de leptina o GLUT-4;

b) tratamiento desmetilante de las células adiposas maduras muy diferenciadas con 5'-aza-2'-citidina a una concentración comprendida entre 0,1 μM y 175 μM hasta la aparición de los marcadores típicos del estado embrionario no diferenciado y/o la reducción en la expresión de los marcadores adipogénicos de fase de diferenciación tardía.

3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la concentración de 5'-aza-2'-citidina se selecciona de entre 100 μM, 125 μM, 150 μM, 175 μM.

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dichos marcadores típicos del estado embrionario no diferenciado se seleccionan de entre OCT4, SOX2, NANOG, SSEA-1 y fosfatasa alcalina o una combinación de los mismos.

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dichos marcadores adipogénicos de fase de diferenciación tardía se seleccionan de leptina y GLUT-4 o una combinación de los mismos.

6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que dichos factores de diferenciación de la fase ii) se seleccionan de entre insulina, isobutilmetilxantina, dexametasona, indometacina o una combinación de las mismas.

7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que dicho cultivo de la fase iii) presenta una duración de 7 a 10 días.

8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además una fase de inducción de la diferenciación en un sentido osteogénico, condrogénico o miogénico.

9. Utilización de 5'-aza-2'-citidina a una concentración comprendida entre 0,1 μM y 175 μM para la inducción de la capacidad de formación de células madre multipotentes partiendo de adipocitos o preadipocitos.

10. Utilización según la reivindicación 9, en la que la concentración de 5'-aza-2'-citidina se selecciona de entre 100 μM, 125 μM, 150 μM, 175 μM.

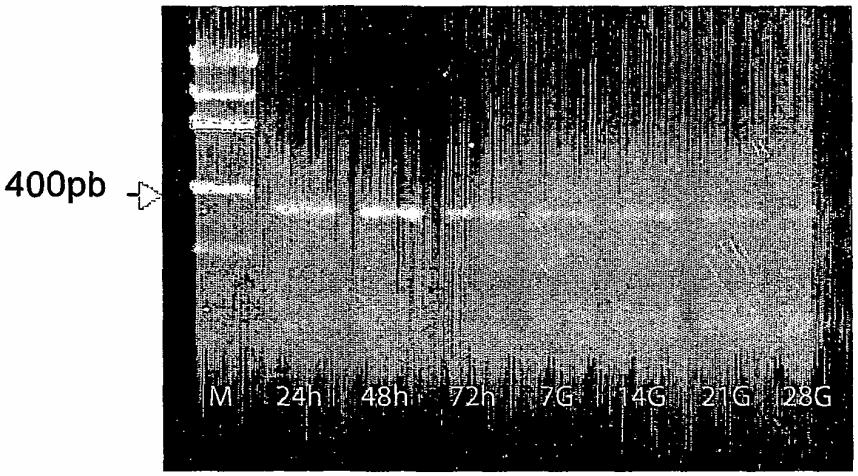
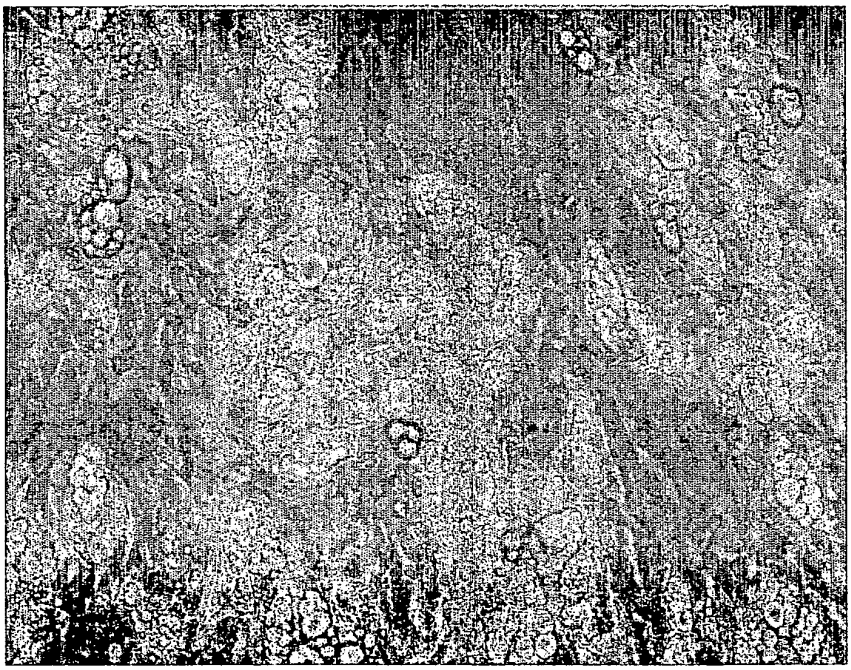


Fig. 1

Microscopia óptica



5'-azacitidina 1 μM

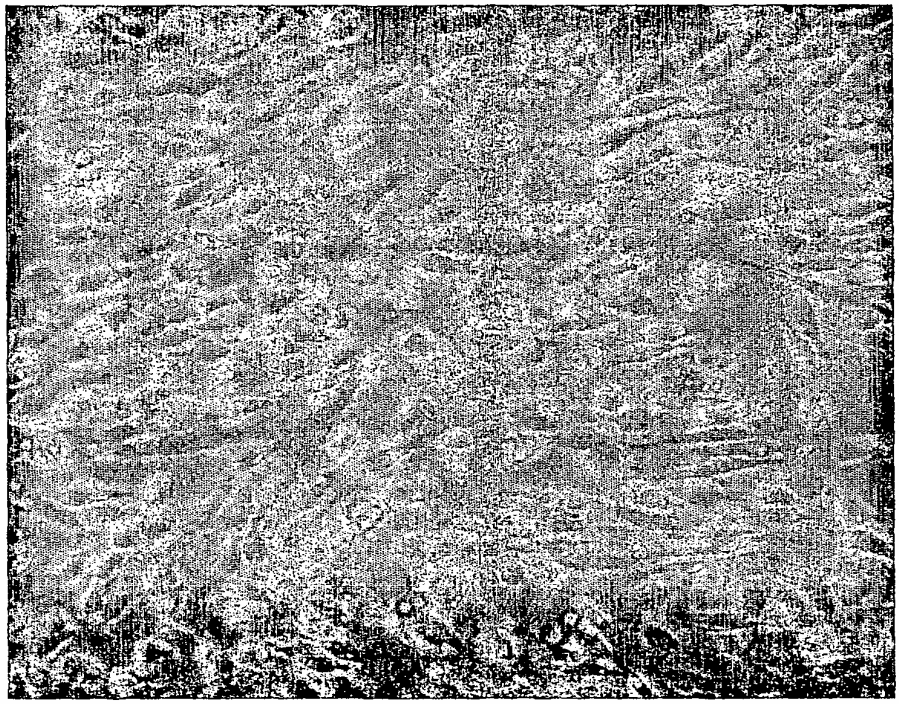
Fig. 2

Microscopia óptica

5'-azacitidina 10 μM

Fig. 3

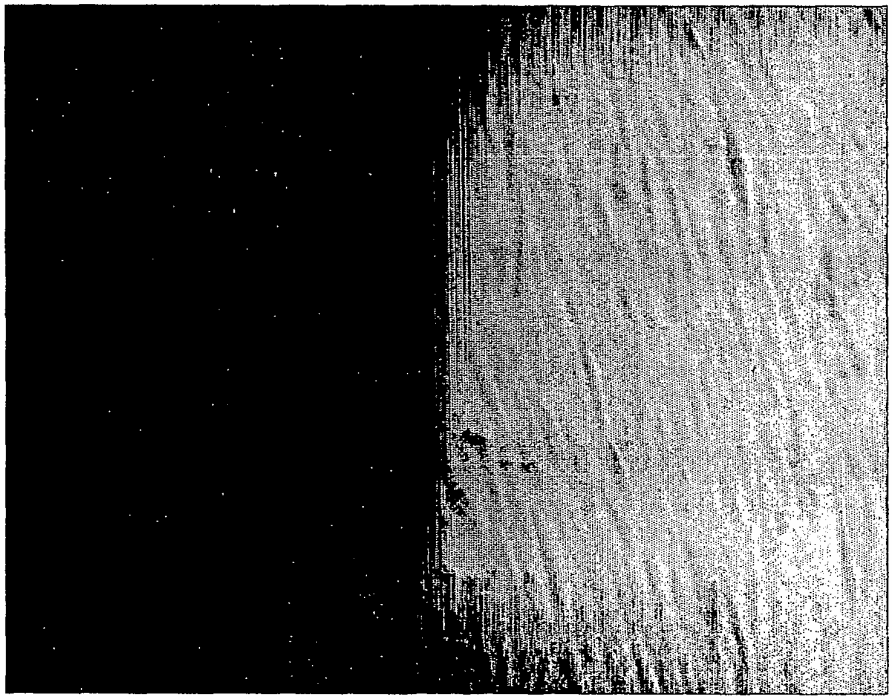
Microscopia óptica



5'-azacitidina 100 μM

Fig. 4

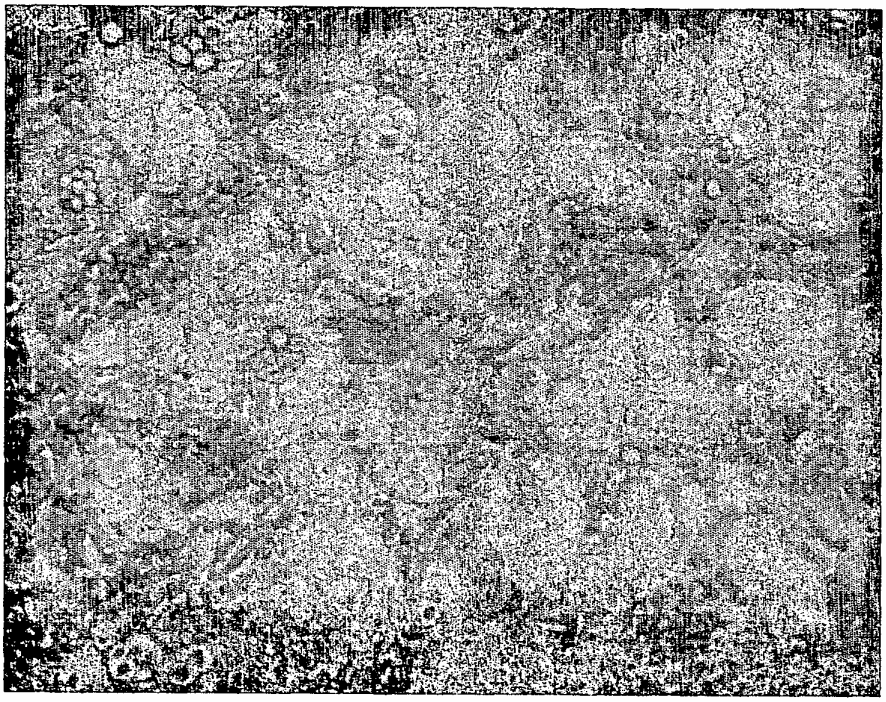
Microscopia óptica



5'-azacitidina 175 μM

Fig. 5

Microscopia óptica



5'-azacitidina - referencia

Fig. 6

Fig. 7

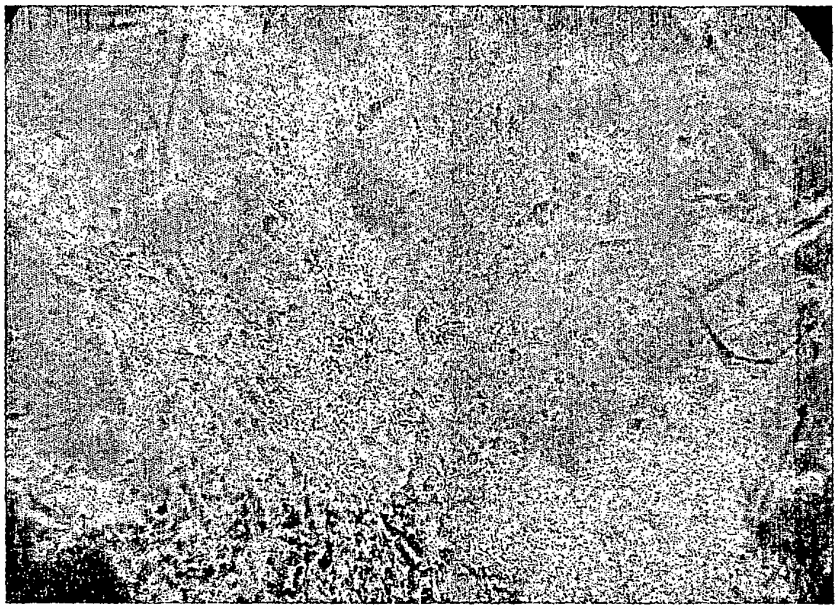
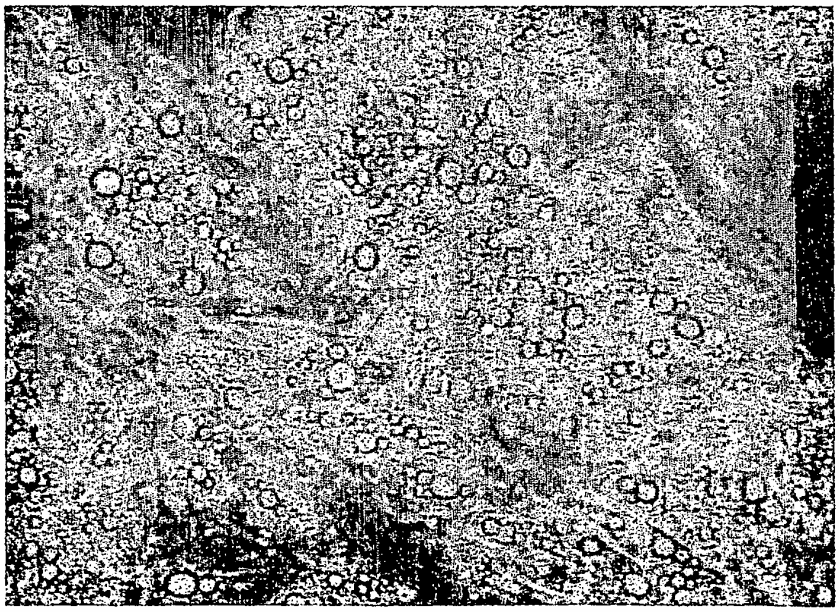



Fig. 8