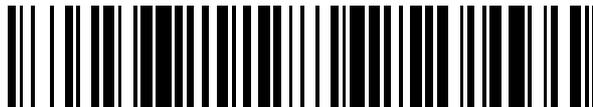


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 354**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/704** (2006.01)

**A61K 31/7024** (2006.01)

**A61P 9/10** (2006.01)

**A61P 9/00** (2006.01)

**A61K 31/19** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2006 E 06805090 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2013 EP 1848440**

54 Título: **Composición farmacéutica y método para regenerar miofibras en el tratamiento de lesiones musculares**

30 Prioridad:

**27.10.2005 WO PCT/IB2005/003202**

**27.10.2005 WO PCT/IB2005/003191**

**13.04.2006 US 791462 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**30.10.2013**

73 Titular/es:

**LEAD BILLION LIMITED (100.0%)  
22/F, CHEVALIER COMMERCIAL CENTRE 8  
WANG HOI ROAD KOWLOON BAY  
KOWLOON, HONG KONG, CN**

72 Inventor/es:

**LI, MING;  
CHENG, LEI y  
LIU, HONGWEI**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 427 354 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

Composición farmacéutica y método para regenerar miofibras en el tratamiento de lesiones musculares

**Campo de la invención**

5 Esta invención se refiere a una composición farmacéutica para uso en un método de regeneración de miocitos y miocardio para el tratamiento de daños musculares. En particular, se refiere a una composición farmacéutica para uso en un método para la regeneración de cardiomiocitos en el tratamiento o la reparación de los daños o lesiones de los músculos del corazón causados por una enfermedad isquémica.

**Antecedentes de la invención**

10 El infarto de miocardio (MI), o ataque al corazón, es una enfermedad debida a la interrupción del suministro de sangre a una parte del corazón, causando daño o la muerte de las células de los músculos del corazón. Es la principal causa de muerte en el mundo tanto de hombres como de mujeres. Después de un infarto de miocardio, no parece que haya ningún proceso natural de reparación capaz de generar nuevos cardiomiocitos que sustituyan las células musculares perdidas. En cambio, los tejidos cicatrizales pueden reemplazar el miocardio necrosado, causando un mayor deterioro de la función cardíaca.

15 La sustitución terapéutica del tejido cardíaco necrosado por miocitos cardíacos funcionales recién regenerados es un tratamiento ideal que hasta hace poco era poco realista, debido a que se consideraba que los miocitos cardíacos estaban diferenciados terminalmente, o en otras palabras, el corazón es un órgano que no se regenera después de la mitosis. Este dogma, sin embargo, ha sido recientemente cuestionado por Beltrami et al., y otros, que documentaron que una población de miocitos residentes en los miocardios puede replicarse y lo hace después de un infarto. Con el fin de promover y mejorar la reparación de los miocardios infartados, se ha intentado el trasplante de cardiomiocitos o mioblastos esqueléticos, pero no ha tenido mucho éxito la reconstitución de miocardios funcionales y de vasos coronarios. El trasplante de células madre mesenquimatosas (MSC<sup>1</sup>) derivadas de médula ósea de adulto para la reparación cardíaca después de un infarto de miocardio ha dado lugar a algo de angiogénesis y miogénesis, pero la ubicación de los miocitos cardíacos recién regenerados se encontró mayoritariamente a lo largo de la zona fronteriza donde el suministro de sangre está relativamente menos afectado<sup>1-3</sup>.

20  
25

Debido a que el infarto de miocardio (MI) agudo produce daños rápidos o muerte a los miocitos (células de los músculos del corazón), a las estructuras vasculares y a los componentes no vasculares en la región suministrada del ventrículo, la regeneración de nuevos miocitos cardíacos para reemplazar los miocardios infartados (tejidos musculares del corazón) en la zona infartada central (la región isquémica absoluta) por medio de una subpoblación de crecimiento de miocitos cardíacos<sup>4-8</sup> o por solo trasplante de MSC<sup>1-3</sup> parece que no es posible sin el restablecimiento temprano localmente de la red de suministro de sangre. Esto explica probablemente por qué la regeneración de miocitos cardíacos después del trasplante solo de MSC se producía principalmente a lo largo de la zona fronteriza adyacente al infarto cuando se mantiene ampliamente el suministro de sangre<sup>1-11</sup>. Por lo tanto, la pérdida de miocardios, arteriolas y capilares en la zona central del infarto parecía ser irreversible, conduciendo finalmente a la formación de la cicatriz.

30  
35

Un estudio más reciente<sup>12</sup> documentó que el trasplante en el corazón de MSC modificadas previamente con Akt exógena *in vitro* producía mejor resultado. No obstante, los miocitos cardíacos regenerados sólo podían infiltrarse desde la zona fronteriza a la zona cicatrizada, lo que indica que la sobreexpresión de Akt exógena, aunque mejora el potencial de supervivencia de las MSC trasplantadas, no es por sí misma suficiente para que puedan sobrevivir en las regiones isquémicas centrales. Además, incluso en las zonas fronterizas menos isquémicas, se observó que los miocitos cardíacos en regeneración derivados de las MSC estaban dispersados y parecían tener dificultad para agruparse y formar miocardios en regeneración. Esto es debido probablemente a una mala eficiencia en la diferenciación cardiomiogénica de las MSC trasplantadas supervivientes. El conocimiento de que la reproducción natural de los cardiomiocitos, incluyendo la diferenciación de los miocitos progenitores residenciales o células madre reclutadas de otras fuentes, tales como de células endoteliales o de un nicho en la médula ósea no es suficiente para equilibrar la muerte de los cardiomiocitos producida en un corazón dañado crónicamente o de forma aguda, ha apaciguado el entusiasmo de los investigadores que pensaban que la regeneración miocárdica representaría un método prometedor para el tratamiento de las enfermedades cardíacas.

40  
45

La técnica anterior parece enseñar que hay tres requisitos importantes críticos para la regeneración de miocitos funcionales en la totalidad de las zonas de los miocardios infartados: 1) el aumento de la viabilidad de las células trasplantadas de modo que puedan sobrevivir durante el período isquémico absoluto, es decir, el período comprendido entre la inyección de las células del donante y la formación de nuevos vasos; 2) la reconstitución temprana de la red de suministro de sangre dañada en los miocardios infartados para sostener la supervivencia y el tráfico eficaz de las células trasplantadas y mantener la oxigenación y el suministro de nutrientes; y 3) la mejora de la eficacia de

50

<sup>1</sup> Todas las abreviaturas empleadas en el presente texto corresponden a las expresiones en inglés por ser las usualmente empleadas en la literatura médica. A modo de ejemplo MSC= Mesenchymal Stem Cells =células madres mesenquimatosas; MI = Myocardial Infarction; MHC = Myosin Heavy Chain, etc. etc.(N. del T.)

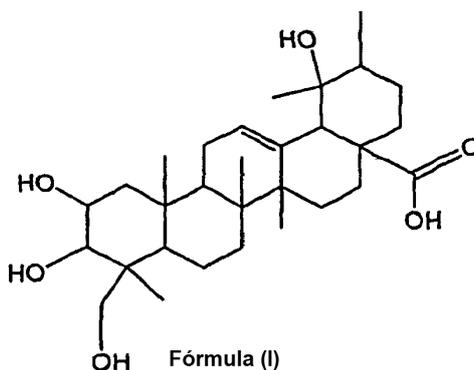
la diferenciación cardiomiogénica de las células trasplantadas para permitir que más células supervivientes del donante se diferencien en células de linaje cardíaco.

Por lo tanto, para comprender el ideal terapéutico de sustitución de los tejidos cardíacos necrosados por miocitos cardíacos funcionales recién regeneradas, se necesitan nuevas propuestas terapéuticas, por ejemplo, una propuesta que utilice compuestos químicos que posean propiedades biológicas que satisfagan suficientemente los tres requisitos antes mencionados con el fin de servir las necesidades terapéuticas para tratar el infarto de miocardio.

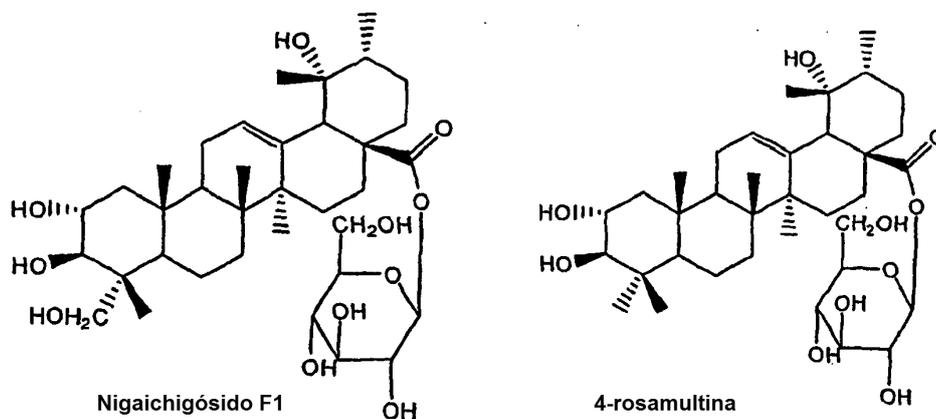
El documento WO 03/043645 describe el uso de un extracto orgánico de *Geum japonicum* en el tratamiento de la enfermedad isquémica. Sin embargo, no se identifican los componentes activos del extracto. Shigenaga et al., en *Phytochemistry*, Vol. 24, Nº 1, pp 115-118 (1985) describen las estructuras de ciertos glucósidos del *Geum japonicum* pero no les atribuyen ninguna actividad terapéutica. La patente de EE.UU. 5.916.919 describe la actividad anti-VIH de ciertos glucósidos de *Geum japonicum*.

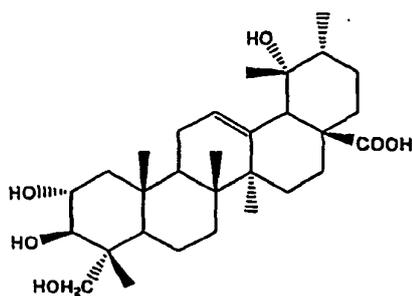
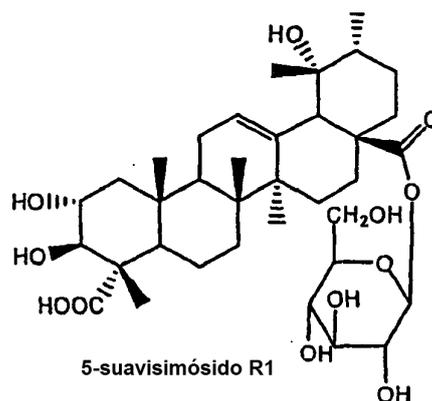
### Sumario de la invención

Como un objeto de la presente invención, se proporciona el uso, en la fabricación de una composición farmacéutica, de un compuesto seleccionado entre el grupo de compuestos químicos que comparten una estructura del esqueleto común de fórmula (I). Los compuestos tienen potentes efectos terapéuticos beneficiosos no sólo sobre el potencial de supervivencia y la eficacia de la diferenciación cardiogénica de las MSC *ex vivo*, sino también en la reparación del MI *in vivo*. Estos compuestos por sí mismos son conocidos en la técnica, pero nunca se ha sabido que posean las actividades biológicas y los efectos terapéuticos antes citados. Por consiguiente, la invención también proporciona los compuestos *per se*, para su uso en el tratamiento del MI. Los compuestos se pueden aislar a partir de fuentes naturales, en particular de plantas, o también se pueden obtener por medio de síntesis semi-químicas o totalmente químicas, con técnicas de síntesis desarrolladas existentes o futuras. La estructura del esqueleto posee por sí misma los efectos miogénicos antes mencionados y se pueden realizar diversas variantes en la estructura del esqueleto por sustitución de uno o más átomos de hidrógeno en diferentes posiciones. Estas variantes comparten el esqueleto común y los efectos miogénicos. Naturalmente, pueden variar en potencia miogénica.

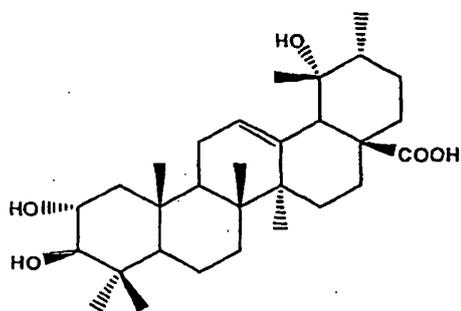


Tal como se utiliza en esta solicitud, la expresión "el compuesto de fórmula (I)" abarca las variantes sustituidas con actividades biológicas similares. Estas variantes se presentan a continuación, poseyendo todas efectos similares en términos de regeneración de miocitos funcionales:

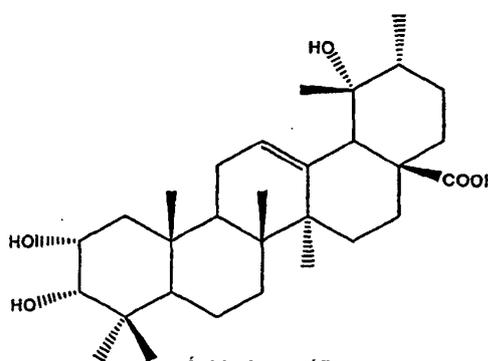


Ácido 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,19 $\alpha$ ,23-tetrahidroxiurs-12-en-26-oico

5-suavisimósido R1



Ácido 3-torméntico



Ácido 6-euscáfico

5 Se contempla, que un experto en la técnica consideraría que los compuestos anteriores pueden formar sales con ácidos minerales y orgánicos y también pueden formar derivados, tales como profármacos. "Profármaco" significa una forma inactiva del compuesto debida a la unión de uno o más grupos protectores especializados utilizados de manera transitoria para alterar o eliminar propiedades indeseables en la molécula original, que se metaboliza o convierte en el compuesto activo en el interior del cuerpo (*in vivo*) una vez administrado.

10 La composición farmacéutica de la presente invención es útil para el tratamiento de lesiones o necrosis miocárdicas causadas por una enfermedad, particularmente por MI, por medio de la regeneración de los tejidos cardiacos. La composición farmacéutica se puede formular por medios convencionales conocidos por los expertos en la técnica en una forma de dosificación adecuada, tal como comprimido, cápsula, inyección, solución, suspensión, polvo, jarabe, etc., y administrar a un sujeto mamífero que tenga lesiones o necrosis miocárdicas.

15 La composición farmacéutica de la presente invención se puede formular en un modo adecuada para administración oral, inyección sistémica e inyección local directa en el corazón o implante en una parte del cuerpo para liberación lenta a largo plazo.

20 En otro aspecto, un compuesto de acuerdo con la presente invención es capaz de regenerar cardiomiocitos funcionales en un mamífero que necesita reemplazar tejidos cardiacos muertos o dañados por una enfermedad cardiaca, tal como infarto de miocardio (MI). Esto es una propuesta terapéutica basada en el trasplante de células, que implica las etapas de: (a) obtener células madre, tales como las MSC; (b) poner en contacto las células madre con un compuesto de la fórmula (I) para activar las vías de diferenciación cardiogénica antes del trasplante; y (c) a continuación trasplantar las células activadas en los tejidos cardiacos infartados del mamífero. Esta propuesta terapéutica es capaz de alcanzar los siguientes objetivos: 1) mejor potencial de supervivencia de las células trasplantadas; 2) reconstitución temprana de la red de suministro de sangre; y 3) mejor eficacia de la diferenciación cardiomiogénica de las células trasplantadas por activación *ex vivo* de las MSC, formando progenitores cardiogénicos antes del trasplante.

30 En otro aspecto, un compuesto de acuerdo con la presente invención es capaz de tratar enfermedades cardiacas isquémicas, particularmente MI en mamíferos, que comprende las etapas: (a) cultivar las MSC o células endoteliales con un compuesto de fórmula (I) o sus derivados funcionales; (b) recoger el medio acondicionado de las células tratadas, que contiene proteínas segregadoras que son activas en la realización de la reparación del infarto cardiaco o la diferenciación cardiogénica de las MSC; y (c) administrar o suministrar el medio acondicionado al tejido cardiaco a la zona infartada.

Los diversos aspectos de novedad que caracterizan la invención se señalan en detalle en las reivindicaciones anexas y forman parte de esta descripción. Para una mejor comprensión de la invención, sus ventajas operativas y objetos específicos alcanzados por su uso, debe hacerse referencia a los dibujos y la siguiente descripción en la que se ilustran y describen realizaciones preferidas de la invención.

- 5 Las células madre, las MSC y las células precursoras miogénicas usadas en la presente invención no proceden de embriones humanos.

### Breve descripción de los dibujos

10 La Fig. 1 resume el proceso de aislamiento de nigaichigósido F1 (denominado factor cardiomiogénico ("CMF")) de la planta *Geum japonicum*, como un ejemplo de preparación del compuesto de la presente invención.

La Fig. 2 muestra los efectos de CMF sobre la diferenciación cardiogénica de las MSC y la sobreexpresión de fosfo-Akt1 *ex vivo*.

La Fig. 3 muestra el efecto terapéutico de un tratamiento basado en el trasplante de las MSC tratadas previamente con CMF.

15 La Fig. 4 muestra la distribución de la fracción de eyección (EF) y del acortamiento fraccional (FS) 2 días y 2 semanas después del trasplante celular en tres grupos de ratas (A: grupo normal; B: grupo con MI trasplantado con MSC tratadas con CMF; C: grupo con MI trasplantado con MSC no tratadas con CMF).

La Fig. 5 muestra los efectos terapéuticos de CMF sobre el infarto de miocardio (MI) en un modelo animal.

20 La Fig. 6 muestra la mejor proliferación de MSC cultivadas y la regeneración miocárdica inducida por un medio acondicionado.

La Fig. 7 muestra la fuente celular para la regeneración miocárdica inducida por CMF en modelos de animales con MI.

### Descripción detallada de las realizaciones particulares

#### I. Procedimientos experimentales.

25 Todos los protocolos utilizados en la presente invención se ajustan a la *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio) publicada por U.S. National Institutes of Health, y fueron aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad China de Hong Kong.

En la siguiente estudio, CMF se refiere al compuesto base (o compuesto del esqueleto) de la presente invención. Su estructura química está definida por la fórmula (I) mostrada anteriormente.

30 *Obtención de los compuestos de la presente invención:* Los compuestos se pueden preparar a partir de plantas, aunque puede ser posible obtenerlos por medio de síntesis química.

35 Como un ejemplo para ilustrar el proceso de preparación de los compuestos a partir de fuentes naturales, a continuación se proporcionan detalles involucrados en el aislamiento y la purificación de los CMF a partir de una especie de planta, *Geum japonicum*. Otras plantas que puedan contener CMF o sus variantes incluyen, por ejemplo, *Acaena pinnatifida* R. et P., *Agrimonia pilosa* Ledeb., *Asparagus filicinus*, *Ardisia japonica*, *Campsis grandiflora*, *Campylotropis hirtella* (Franch. Schindl.), *Caulis sargentodoxae*, *Cedrela sinensis*, *Chaenomeles sinensis* KOEHNE, *Debregeasia salicifolia*, *Eriobotrya japonica calli*, *Eriobotrya japonica* LINDL. (Rosaceae), *Goreishi*, *Leucoseptum stellipillum*, *Ludwigia octovalvis*, *Perilla frutescens*, *Perilla frutescens* (L.) britt. (Lamiaceae), *Physocarpus intermedius*, *Potentilla multifida* L., *Poterium ancistroides*, *Pourouma guianensis* (Moraceae), *Rhaponticum uniflorum*, *Rosa bella* Rehd. et Wils., *Rosa laevigata* Michx., *Rosa rugosa*, *Rubus alceaefolius* Poir., *Rubus allegheniensis*, *Rubus coreanus*, *Rubus imperialis*, *Rubus imperialis* Chum. Schl. (Rosaceae), *Rubus sieboldii*, *Rumexjaponicus*, *Salvia trijuga* Diels, *Strasburgeria robusta*, Fresa variedad Houkouwase, *Tiarella polyphylla*, *Vochysia pacifica* Cuatrec, *Zanthoxylum piperitum*, etc.

45 *Aislamiento del factor cardiomiogénico (CMF) de Geum japonicum:* Con referencia a la Fig. 1, la planta de *Geum japonicum* recogida en la provincia de Guizhou de China en agosto se secó (10 kg) y se percoló dos veces con etanol al 70% (100 L) a temperatura ambiente durante 3 días. Se reunieron los extractos y se secaron por pulverización obteniéndose un residuo sólido (1 kg). El residuo sólido se puso en suspensión en 10 litros de H<sub>2</sub>O y se repartió sucesivamente en cloroformo (10 L) dos veces y a continuación en n-butanol (10 L) dos veces obteniéndose las fracciones correspondientes. La fracción soluble en n-butanol (GJ-B) se filtró y se secó mediante secado por pulverización obteniéndose una fracción de polvo, de la que se confirmó su capacidad específica para estimular la diferenciación cardiogénica de las MSC en cultivo celular del modo descrito a continuación. Se demostró que la fracción soluble en n-butanol (GJ-B) podía mejorar la proliferación y diferenciación cardiogénica de las MSC cultivadas en sistemas de cultivo celular. La fracción GJ-B se aplicó a continuación a una columna de Sephadex LH-20 equilibrada

con metanol al 10% y se eluyó con una concentración creciente de metanol en agua, obteniendo 7 fracciones, GJ-B-1 a GJ-B-7. En todas las fracciones eluidas se analizó su actividad con sistemas de cultivo de MSC. El ensayo de actividad demostró que la fracción 6 era la más activa para mejorar la diferenciación cardiogénica de las MSC cultivadas. De la fracción GJ-B-6, se aisló además un compuesto activo puro, que se denomina CMF en esta descripción. La estructura de CMF se determinó por análisis de NMR y en comparación con la bibliografía, demostrándose que tenía la fórmula (I).

*Preparación de las MSC para trasplante:* Las MSC se cultivaron con CMF (10 µg/mL en un medio de crecimiento) durante 6 días. En paralelo, las MSC de control se cultivaron en un medio de crecimiento que contenía un volumen equivalente de DMSO al 5%. El día 2, se evaluó la expresión de fosfo-Akt1 endógena por inmunocitoquímica y transferencia de Western. El día 4, se evaluó la diferenciación miogénica por inmunocitoquímica y transferencia de Western frente a MFE2, que fue confirmada además por inmunocitoquímica y transferencia de Western con un anticuerpo específico de la cadena pesada de miosina (abreviadamente en lo sucesivo MHC) el día 6. El día 3, tanto las MSC tratadas previamente con CMF como las MSC de control se marcaron con CM-Dil en cultivo y se dejaron listas para trasplante.

*Preparación de células madre mesenquimatosas de médula ósea:* Se extrajeron los huesos tibias/fémur de ratas Sprague-Dawley (SD) y se arrastró la médula ósea (BM) de los huesos con un medio de cultivo MIDM que contenía suero fetal de bovino al 10% inactivado por calor (GIBCO) y penicilina al 1%/estreptomicina. La BM se mezcló a fondo y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. El sedimento celular se puso en suspensión en 5 mL de medio de crecimiento. La suspensión celular se colocó cuidadosamente en 5 mL de solución de Ficoll y se centrifugó a 200 rpm durante 30 minutos. La segunda capa, que contenía las células de BM, se transfirió a un tubo y se lavó dos veces con PBS para eliminar la solución de Ficoll (1200 rpm durante 5 minutos). El sedimento celular se volvió a poner en suspensión en medio de cultivo MIDM que contenía suero fetal de bovino al 10% inactivado por calor (GIBCO) y mezcla de los antibióticos penicilina al 1%/estreptomicina. Después de 24 horas de cultivo en una incubadora a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5%, se desecharon las células no adherentes y las células adherentes se cultivaron cambiando el medio una vez cada 3 días, llegando las células a ser casi confluentes después de 14 días de cultivo. Estas eran las células de BM, denominadas MSC de aquí en adelante, que se utilizaron para estudios *in vitro* e *in vivo* realizados en la presente descripción.

*Análisis por transferencia de Western:* Extractos de células enteras de las células tratadas con CMF o de células de control se prepararon por lisis de las células con 3 veces el volumen de células empaquetadas de tampón de lisis (Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Nonidet P-40 al 1%, glicerol al 10%, NaF 200 mM, pirofosfato de sodio 20 mM, 10 mg/ml de leupeptina, 10 mg/ml de aprotinina, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 200 mM y ortovanadato de sodio 1 mM) en hielo durante 30 minutos. El rendimiento de proteínas se cuantificó por medio del kit de ensayo de proteínas Bio-Rad DC (Bio-Rad). Cantidades iguales (30 µg) de proteínas totales se fraccionaron por tamaños por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDM (Millipore). Las transferencias se bloquearon con solución salina tamponada con fosfato más 0,1% (vol/vol) de Tween 20 (PBST) que contenía 5% (peso/volumen) de leche en polvo (PBSTM) durante 30 minutos a temperatura ambiente y se sondaron durante 60 minutos con anticuerpos primarios específicos contra fosfo-Akt1 de rata (ratón) o MHC de rata (ratón, Sigma-Aldrich), se diluyeron 1:1000 en PBSTM. Después de lavar extensamente en PBST, las transferencias se sondaron con IgG anti-ratón acoplada a peroxidasa de rábano silvestre (Amersham Biosciences) (dilución 1/1000 en PBSTM, 60 minutos), se lavaron extensamente con PBST y se desarrollaron por quimioluminiscencia.

*Trasplante de las MSC tratadas previamente con CMF al tejido cardíaco:* Se utilizaron ratas Sprague-Dawley (SD) y todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el University Animal Committee on Animal Welfare. Cada rata se anestesió con pentobarbital por vía intraperitoneal (50 mg/kg), se intubó y se ventiló mecánicamente con aire ambiente usando un respirador Harvard (modelo 683). Después de una toracotomía izquierda, se indujo un infarto de miocardio por la ligadura permanente de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD). 5 × 10<sup>5</sup> MSC tratadas previamente con CMF y marcadas con Dil (32 ratas) en suspensión en solución salina se inyectaron en tres sitios del miocardio distal (la región isquémica) de la arteria recién ligada después de la ligadura, respectivamente (grupo de ensayo). Las ratas de control se inyectaron con una cantidad equivalente de MSC de control no tratadas marcadas con Dil (32 ratas) en suspensión en solución salina en el mismo lugar y momento. Para una isquemia simulada (32 ratas), la toracotomía se realizó sin ligadura de LAD. Dieciséis ratas no sometidas a tratamiento se asignaron como control normal.

La mitad de las ratas experimentales de diferentes grupos se sacrificaron de acuerdo con el plan experimental el día 7 y el día 14 posteriores al infarto, después de la evaluación de su función cardíaca por medidas ecocardiográficas. Se extrajeron los corazones de las ratas sacrificadas, se lavaron con PBS y se fotografiaron respectivamente. Todas las muestras recogidas se empotraron en parafina y se cortaron en secciones para rastrear las señales de Dil y el examen de revascularización, el tamaño del infarto y la regeneración de los miocardios. Si las células en regeneración fueran positivas al Dil, se realizó una tinción inmunohistoquímica adicional con el MHC para confirmar su diferenciación cardiomiogénica.

La localización conjunta del marcador Dil y la expresión del marcador cardíaco específico se examinaron con un microscopio confocal (Zeiss LSM 510 META). En pocas palabras, las secciones se tiñeron inmunohistoquímicamente con anticuerpos de de troponina I específicos de rata. La confirmación de la diferenciación cardiomiogénica de las

MSC trasplantadas marcadas con Dil que forman miocardios en regeneración se llevó a cabo uniendo las células positivas a Dil, lo que indica su origen de células del donante, con la tinción positiva específica del marcador troponina I de diferenciación terminal cardíaca utilizando un examen por microscopía confocal, lo que implica su diferenciación cardiomiogénica de estas células trasplantadas.

5 *Tratamiento directo con CMF en el modelo de Mí:* Se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos treinta y dos ratas SD: grupo normal, grupo de simulación, grupo tratado con CMF y grupo de control no tratado (8 ratas cada uno). Las ratas se anestesiaron con pentobarbital (50 mg/kg) por vía intraperitoneal, se intubaron y se ventilaron mecánicamente con aire ambiente usando un respirador Harvard (modelo 683). Después de una toracotomía izquierda, se indujo un infarto de miocardio por la ligadura permanente de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD). Se inyectó CMF en DMSO al 5% (0,1 mL, que contenía 0,1 mg de CMF) en el miocardio distal (la región isquémica) de la arteria ligada en 8 ratas inmediatamente después de la ligadura (grupo tratado con CMF). A otras 8 ratas se les inyectó una cantidad equivalente de DMSO al 5% en el mismo lugar y momento que al grupo de control no tratado. Para una isquemia simulada, la toracotomía se realizó sin ligadura de LAD en 8 ratas. Otras 8 ratas sin tratamiento se asignaron como grupo normal.

15 *Medio acondicionado que contiene proteínas secretoras procedentes de MSC o de otras células inducidas por CMF:* Las MSC se trataron con 10 µg/mL de CMF durante 24 horas para activar/sobrerregular las expresiones de genes y luego se lavaron a fondo para eliminar los residuos de CMF. A continuación, se añadieron al cultivo 5 mL de medio de crecimiento de nueva aportación y se recogió después de otros 3 días de cultivo. El medio recogido se denominó medio acondicionado. Los 5 mL de medio acondicionado se condensaron hasta un volumen de 1 mL y se usó como agente de tratamiento en el modelo animal de infarto cardíaco como se describió anteriormente. En pocas palabras, después de una toracotomía izquierda y ligadura de LAD, se inyectaron 0,2 mL del medio acondicionado inmediatamente en la parte distal de la ligadura. El medio de crecimiento de nueva aportación se utilizó como control.

25 *Sustitución en la médula ósea con MSC marcadas con Dil:* Se utilizaron dieciséis ratas SD de 5 semanas para el trasplante de médula ósea. Las ratas receptoras fueron irradiadas por 9,5 Gy de irradiación gamma procedente de una fuente de <sup>137</sup>Cs (Elite Grammacell 1000) a una dosis de 1,140 Gy/min hasta destruir completamente las células madre procedentes de la médula ósea de la rata. A continuación se inyectaron MSC marcadas con Dil ( $2 \times 10^8$  células en suspensión en 0,3 mL de PBS) a través de la vena de la cola en las 2 horas siguientes a la irradiación usando una aguja de calibre 27. Una semana después de la irradiación y el trasplante, las ratas con médula ósea marcada con Dil se dividieron en dos grupos: uno para ser tratado directamente con CMF y el otro como control sin tratamiento. Se realizaron una cirugía de infarto de miocardio y un esquema de tratamiento como se ha descrito anteriormente. El experimento se terminó el día 14 posterior a la cirugía y al tratamiento para una evaluación adicional. Se obtuvieron muestras del corazón de las ratas sacrificadas. Todas las muestras se rastrearon para buscar células positivas al Dil y su diferenciación cardiomiogénica por tinción inmunohistoquímica con anticuerpos específicos para la troponina I de tipo cardíaco (Santa Cruz) y PCNA (Dako). Se utilizó un anticuerpo secundario específico conjugado con fosfatasa alcalina (Santa Cruz) para visualizar las células teñidas positivamente. Se observó señal positiva al Dil con un microscopio de fluorescencia (Laica).

35 *Estimación del tamaño del infarto:* Se extrajeron los ventrículos izquierdos de las ratas de experimentación sacrificadas el día 14 y se cortaron en rodajas desde el vértice hasta la base en 3 rodajas transversales. Las rodajas se fijaron en formalina y empotraron en parafina. Las secciones (20 µm de espesor) del ventrículo izquierdo se tiñeron con tricromo de Masson, que marca azul el colágeno y rojo el miocardio. Estas secciones se digitalizaron y toda la tinción azul se cuantificó morfométricamente. El volumen de infarto (mm<sup>3</sup>) de una sección particular se calculó basándose en el espesor de la rodaja. Se añadieron los volúmenes del tejido infartado a todas las secciones obteniéndose el volumen total del infarto para cada corazón particular. Todos los estudios fueron realizados a ciegas por un patólogo.

40 *Evaluación angiogénica en la región del infarto:* Se determinó la densidad vascular 7 días después del infarto en las secciones histológicas mediante el recuento del número de vasos dentro de la zona del infarto utilizando un microscopio óptico bajo un campo de alta potencia (HPF) (400 aumentos). Se utilizaron seis HPF aleatorios y no solapantes en el campo del infarto para el recuento de todos los vasos recién formados en cada sección de todos los corazones de experimentación. Se hizo la media del número de vasos en cada HPF y se expresó como el número de vasos por HPF.

45 *Evaluación de la regeneración de miocitos cardíacos y miocardio:* Las secciones de ambos grupos trasplantados con MSC tratadas previamente con CMF y grupos trasplantados con MSC no tratadas el día 7 después de la ligadura se tiñeron con anticuerpos Ki67 o de la cadena pesada de miosina (MHC) para identificar la miocardios en regeneración. Para visualizar las manchas positivas se utilizó un anticuerpo secundario específico conjugado con fosfatasa alcalina. En pocas palabras, las secciones empotradas en parafina se sometieron a microondas en un tampón de EDTA 0,1 M y se tiñeron con un anticuerpo de conejo policlonal con especificidad contra Ki67 de rata en dilución 1:3000 (Santa Cruz Biotechnology) y se incubaron durante la noche a 4°C. Después de que se lavaron, las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario IgG anti-conejo de cabra conjugado con fosfatasa alcalina a una dilución 1:200 (Sigma) durante 30 minutos, y los núcleos positivos se visualizaron como azul oscuro con un kit con el sustrato azul de tetrazolio 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato-p-toluidina-nitro (Dako). Las secciones vecinas inmediatas procedentes del bloque de tejido en parafina correspondiente se incubaron durante la noche a 4°C en una dilución 1:50 de anticuerpos de MHC anti-rata de conejo (MF20, Developmental Hybridoma Bank, University of Iowa), y se

incubaron adicionalmente durante 30 minutos a temperatura ambiente en una dilución 1:100 de IgG anti-conejo de cabra conjugada con peroxidada (Sigma). Después de la incubación con 1 mg/mL de 3,3'-diaminobencidina (DAB; más H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,02%), los portaobjetos fueron investigados por análisis microscópico. La zona de los miocardios en regeneración se definió en el campo proyectado por una rejilla que contenía 42 puntos de muestra. Se seleccionaron en cada sección aproximadamente 30 a 60 puntos de cálculo a lo largo de la zona fronteriza de un miocardio en regeneración particular. Esta rejilla definió una zona de tejido sin comprimir de 62.500 µm<sup>2</sup>, que se utilizó para medir los 30-60 puntos de cálculo seleccionados en cada sección. Se determinaron las formas y los volúmenes de los miocardios en regeneración en la zona central de infarto midiendo en cada sección (separación de 50 µm) de aproximadamente 70 secciones las formas y las zonas ocupadas por los miocardios en regeneración y el espesor de las secciones. La integración y el cálculo con estas variables produjo una estereo-estructura y proporcionó el volumen de un miocardio en regeneración particular en la zona central del infarto en cada sección. Se añadieron y se calcularon por ordenador los valores y la estereo-estructura de todas las secciones de un bloque de tejido particular para obtener el volumen total y la estereo-estructura completa de los miocardios en regeneración.

*Evaluación por ecocardiografía de la función miocárdica:* Se realizaron estudios ecocardiográficos usando un Sistema Sequoia C256 (Siemens Medical) con un transductor de matriz lineal de 15 MHz. Se afeitó el pecho de las ratas de experimentación, se situó el animal en posición supina sobre una almohadilla térmica, se colocaron en las extremidades electrodos de electrocardiograma (ECG), y se registró la ecocardiografía bajo anestesia controlada. A cada rata de experimentación se le realizó una ecocardiografía basal antes del método experimental. Se registraron dos imágenes de ecocardiografía bidimensional (2D) y en modo M y guiada bidimensional de vistas de los ejes largo y corto paraesternales. Las dimensiones telesistólica y telediastólica del ventrículo izquierdo (VI), así como los espesores de la pared sistólica y diastólica se midieron a partir de los trazados en modo M usando el convenio del borde delantero de la *American Society of Echocardiography*. Las zonas telediastólica (LVDA) y telesistólica (LVSA) del ventrículo izquierdo se sometieron a planimetría del eje largo paraesternal y se calcularon los volúmenes telediastólico y telesistólico del ventrículo izquierdo (LVEDV y LVESV) s por el método del modo M. La fracción de eyección del ventrículo izquierdo (LVEF) y el acortamiento fraccionario (FS) se derivaron de la zona de la sección transversal del ventrículo izquierdo en la vista de eje corto en 2D:  $EF = [(LVEDV - LVESV)/LVEDV] \times 100\%$  y  $FS = [(LVDA - LVSA)/LVDA] \times 100\%$ . Para los cálculos ecocardiográficos se utilizaron fórmulas estándares. Al final del estudio se analizaron todos los datos fuera de línea con un programa informático residente en el sistema de ultrasonidos. Todos los índices medidos y calculados se presentaron como el valor medio de tres a cinco mediciones consecutivas.

*Estadística:* Todos los datos morfométricos se recogen a ciegas, y el código se revela al final del experimento. Los resultados se presentan como valor medio ± desviación típica calculado a partir de las mediciones medias obtenidas de cada corazón. La significación estadística para la comparación entre dos mediciones se determina utilizando la prueba t de Student no pareada de dos colas. Se consideran significativos los valores de  $p < 0,05$ .

## II. Aumento del potencial de supervivencia inducido por CMF y diferenciación cardiogénica de las MSC *ex vivo*.

Haciendo referencia a la Figura. 2, después del tratamiento de dos días con CMF (10 µg/mL) en el cultivo, la expresión de fosfo-Akt1 fue significativamente sobre-regulada en comparación con el control sin tratar como se demostró por tinción inmunocitoquímica de las células con anticuerpos específicos para fosfo-Akt1, tiñéndose de rojo las células positivas, principalmente en el citoplasma (Figura 2a: 1). La transferencia de Western confirmó el aumento de la expresión de fosfo-Akt1 hasta 3-4 veces más sobre las células no tratadas (Figura 2b: 5A). Entre las MSC sobre-reguladas con fosfo-Akt1, más del 90% de ellas cuando se cultivaron durante 2 días más llegaron a teñirse positivamente con el anticuerpo específico para el factor potenciador de miocitos (MFE2), uno de los marcadores más tempranos para el linaje cardiogénico, tiñéndose de anaranjado en los núcleos las células positivas (Fig. 2a: 2) y confirmado por transferencia de Western (Figura 2b: 6A), lo que indica su compromiso de diferenciación cardiogénica. Se advirtió que las MSC cultivadas no estaban todas teñidas positivamente por el anticuerpo anti-MFE2 (Fig. 2a: 2), como lo indica el núcleo azul, debido posiblemente a que no todas las MSC cultivadas fueron convertidas por vía de la diferenciación cardiogénica por el CMF o debido a que existían en la preparación de las MSC algunas impurezas menores. Del mismo modo, la mayor parte de las MSC cultivadas se tiñeron positivamente con el anticuerpo específico de la cadena pesada de miosina de tipo cardíaco, tiñéndose de rojo en el citoplasma las células positivas (Fig. 2a: 3) y confirmado por transferencia de Western (Fig. 2b: 7A) a los 6 días de cultivo en presencia de CMF, mientras que las células de control estaban teñidas negativamente por los tres anticuerpos específicos (Fig. 2a:4 y 2b: Bs). La inducción secuencial de las expresiones de MFE2 y MHC confirmó el desarrollo de diferenciación cardiogénica inducida por CMF de las MSC *ex vivo*. En la Fig. 2b, A representa la muestra tratada con CMF, mientras B el control sin tratar.

## III. Efecto terapéutico por trasplante de MSC tratadas previamente con CMF

Para determinar si el aumento del potencial de supervivencia y de la eficacia de diferenciación cardiogénica mostradas *ex vivo* en las MSC tratadas con CMF antes del trasplante conseguirían una mejora significativa en la reparación del infarto de miocardio *in vivo*, o en otras palabras, si los efectos de los CMF *ex vivo* tienen valores terapéuticos, se realizaron experimentos de trasplante de células con modelos de animales con MI, donde las MSC tratadas previamente con CMF se implantaron en las zonas infartadas. Se rastrearon la dirección, la supervivencia, la proliferación, la diferenciación cardiomiogénica y la maduración de las células trasplantadas por las señales positivas por flores-

cencia de Dil y por tinción inmunohistoquímica de Ki67 y MHC en secciones, que procedían de los corazones el día 7 y el día 14 después de un infarto y del trasplante de células. Como se muestra en la Figura 3, se observaron células positivas a Dil el día 7 (Figura 3: 1) con el fenotipo característico de un miocito cardíaco en toda la zona del infarto en el grupo de miocardio de ensayo, lo que indica su origen de célula del donante y distribución en toda la zona infartada. En el grupo de control (no tratado con CMF), sólo se pudieron ver señales con Dil dispersado alrededor de la zona fronteriza del infarto (Fig.3: 2). Se observó por microscopía confocal la localización conjunta de las señales con Dil (rojo) y la expresión de la troponina I cardíaca específica (verde) (Figura 3: 3-5) en toda la zona infartada. La imagen mezclada de las señales positivas a Dil (rojas) y de la expresión del marcador troponina I cardíaco específico (verde) dio como resultado colores superpuestos de amarillo-rojo-verde en las mismas células, lo que confirma la diferenciación cardiomiogénica *in vivo* y la maduración de las MSC trasplantadas tratadas previamente *ex vivo* con CMF. También se observó que unas pocas células positivas a troponina I (verde) no eran positivas a Dil (Figura 3: 3 y 5), debido probablemente a que algunos miocitos en regeneración no procedían de las MSC marcadas con Dil trasplantadas. Del mismo modo, algunas células positivas a Dil mostradas en los círculos de color azul claro (Figura 3: 4 y 5) fueron negativas a la inmunotinción con troponina I, lo que indica que una pequeña fracción de las células trasplantadas no realizaban la diferenciación carcinogénica *in vivo* ni impurezas contenidas en la preparación de las MSC.

La formación de nuevos vasos pudo ser detectada tan pronto como 12 horas después del trasplante y se observaron muchos más vasos capilares recientemente formados y llenos de células de la sangre en todas las zonas infartadas en el grupo de ensayo a las 24 horas (antes de que se pudieran ver los miocitos cardíacos en regeneración) y a los 7 días después del infarto (Figura 3: 1, círculos amarillos). La densidad de los vasos recientemente formados en la zona infartada de los miocardios trasplantados con las MSC tratadas previamente con CMF fue el día 7 por término medio de  $8 \pm 2$  por campo de alta potencia (HPF) (40 aumentos). Sin embargo, los nuevos vasos no eran positivos a Dil, lo que indica que la fuente celular de los vasos puede no proceder de las células del donante. Se considera que las MSC del donante pueden ser activadas por tratamiento previo con CMF para estimular y sobre-regular las vías de señalización específica de la angiogénesis que inducen la expresión de ciertos factores angiogénicos, lo que aumenta directamente el proceso de revascularización precoz de miocardios infartados. Por el contrario, el día 7 se observaron aproximadamente  $3 \pm 2$  vasos por HPF en los miocardios infartados de controles trasplantados con MSC no tratadas previamente (Figura 3: 2, círculos amarillos).

Como se muestra en la Figura 3, un gran número de miocitos procedentes de células del donante se agruparon y organizaron en tejido similar a miocardio en la zona infartada, las cuales se tiñeron positivamente por los anticuerpos específicos para la MHC (Figura 3: 6, círculos azules) y Ki67 (Figura 3: 7, círculos azules), lo que indica que estas MSC tratadas previamente con CMF y trasplantadas retuvieron la capacidad de división y diferenciación cardiomiogénica realizada después del trasplante *in vivo*. Bajo un campo de alta potencia, estos tejidos similares a miocardio mostraron la morfología típica de miocardio, excepto que el tamaño era más pequeño que los miocitos existentes no dañados (Figura 3: 9, círculos azules). Estos tejidos similares a miocardios en regeneración altamente organizados ocupaban el día 7 por término medio  $70 \pm 8\%$  del volumen total del infarto y reemplazaban al miocardio infartado en  $80 \pm 8,5\%$  por término medio el día 14 después del infarto en el grupo de miocardio de ensayo (Figura 3: 8, R, miocitos cardíacos regenerados, N miocitos cardíacos normales preexistentes). Esta sustitución del tejido del corazón infartado fue acompañada por una mejora funcional significativa, como se demuestra por las mediciones ecocardiográficas (Figura 4 y Tabla 1). En comparación con el grupo de MI al que se han trasplantado las MSC no tratadas previamente los días 2 y 14 después del infarto, la fracción de eyección (EF) de los corazones con MI a los que se han trasplantados las MSC tratadas previamente fue significativamente mayor ( $59,79 \pm 2,33$  frente a  $52,1 \pm 2,54$ ,  $P = 0,03$ ) el día 2, y aumentó notablemente ( $67,13 \pm 2,53$  frente a  $53,3 \pm 2,31$ ,  $P = 0,001$ ) el día 14. Del mismo modo, los acortamientos fraccionales (FS) del corazón con MI trasplantado fueron significativamente mayores ( $29,43 \pm 1,35$  frente a  $24,07 \pm 1,47$ ,  $P = 0,01$ ) el día 2 y aumentó significativamente ( $31,72 \pm 2,57$  frente a  $23,49 \pm 1,99$ ,  $P = 0,002$ ) el día 14. Las mejoras significativas de EF y FS son un sólido reflejo de la recuperación funcional de los miocitos cardíacos (Tabla 1).

Tabla 1: Distribución de la fracción de eyección (EF) y el acortamiento fraccional (FS). (Valores medios ± SE):

	EF (%)		FS (%)	
	2 días §	14 días ¶	2 días§	14 días¶
Normales (16)	71,03 ± 4,05	68,24 ± 4,79	35,65 ± 3,99	34,02 ± 3,27
Simuladas (32)	70,45 ± 2,67	71,34 ± 2,77	36,03 ± 2,76	35,86 ± 2,13
Pre-tratadas con CMF (32)	59,79 ± 2,33*	67,13 ± 2,53*	29,43 ± 1,35*	31,72 ± 2,57*
MSC de control (32)	52,1 ± 2,54	53,3 ± 2,31	24,07 ± 1,47	23,49 ± 1,99

§, Dieciséis ratas para el grupo normal y 32 ratas para los grupos de operación simulada, con MSC tratadas previamente con CMF y de control con MSC, respectivamente.  
 ¶, Ocho ratas para el grupo normal y 16 ratas para los grupos de operación simulada, con MSC tratadas previamente con CMF y de control con MSC, respectivamente  
 \*, EF,  $P = 0,03$  el día 2;  $P = 0,001$  el día 14, y FS,  $P = 0,01$  el día 2 y  $P = 0,002$  en el día 14.

**IV. Efectos terapéuticos directos en el modelo de MI sin MSC tratadas previamente y trasplante**

Haciendo referencia a la Figura 5, después de la inyección local directa de CMF en el modelo de MI, se encontró dos semanas después de infarto que en el grupo de control (sin tratamiento con CMF) el miocardio en la parte distal del sitio de la ligadura llegó a estar sustancialmente blanco en la inspección visual debido a necrosis isquémica (Figura 5: 2). En contraste, la parte equivalente en los corazones tratados por CMF eran de aspecto relativamente rojo, debido probablemente a neovascularización (Figura 5: 1), que era comparable con las partes no isquémicas del corazón y los tamaños del infarto eran significativamente más pequeños que los de los corazones de control (Figura 5: 2). Además, en la sección transversal de la zona infartada, las paredes del ventrículo izquierdo de los corazones tratados con CMF (Figura 5: 3) eran significativamente más gruesas que las de los corazones de control (Figura 5: 4). Las observaciones histológicas revelaron que los tamaños de infarto en los corazones tratados con CMF ( $n = 8$ ), eran por término medio de aproximadamente 1/3 a 1/2 veces más pequeños que los de los corazones de control ( $n = 8$ ), como se calculó midiendo el volumen del infarto en la pared libre del ventrículo izquierdo el día 14 después de la ligadura. Por tinción con tricromo de Masson, se encontró que en los corazones tratados con CMF, estaban distribuidas en la mayor parte de todas las regiones infartadas agrupaciones de células similares a miocitos, que estaban dispuestas en casi la misma orientación que el miocardio infartado o los miocardios viables vecinos (Figura 5: 5). En contraste, las regiones infartadas de los corazones de control estaban ocupadas casi completamente por sustitución de tejido fibroso, casi sin dejar espacio para cualquier posible regeneración de los cardiomiocitos, si es que hubo alguna (Figura 5: 6). Bajo un campo de energía más alta, en un marcado contraste con la cicatriz fibrosa teñida globalmente de azul en el grupo de control (Figura 5: 8), todas las zonas infartadas en el grupo tratado con CMF estaban llenas de agrupaciones de miocitos en regeneración, bien conformadas para soportar la morfología miocárdica con poco tejido fibroso entre ellas (Figura 5: 7), aunque los tamaños de estos miocitos en regeneración eran más pequeños que los de los miocitos preexistentes vecinos, debido probablemente a que estaban todavía en vías de maduración.

Además, la ecocardiografía demostró que la sustitución de tejido cardíaco infartado con miocardios en regeneración integrados estructuralmente y vasculaturas reconstituidas estaba acompañada por la mejora funcional significativa el día 2 después del infarto en corazones tratados con CMF, y todavía más mejoras el día 14 en comparación con los corazones de control, debido probablemente al crecimiento y maduración de los miocardios y vasculaturas regeneradas que repararon el infarto.

**Efecto terapéutico de medio acondicionado inducido por MSC tratadas con CMF**

Para determinar si el medio acondicionado, que contenía ciertas proteínas inducidas segregadas por MSC activadas con CMF, provocaría efectos similares a los de la aplicación directa de CMF o al trasplante de las MSC tratadas previamente con CMF a la zona infartada, se analizó el medio acondicionado tanto con cultivo de MSC como con modelo animal de infarto cardíaco. Haciendo referencia a la Figura 6a, después de tratamiento con medio acondicionado durante 24 horas, la tasa de proliferación de las MSC aumentó hasta 120% en comparación con el medio de control (medio de crecimiento de nueva aportación). Con referencia a la Figura 6b, la inyección local de medio acondicionado a la región isquémica del modelo de MI, se observó la regeneración de cardiomiocitos. Dicho brevemente, se observaron muchos cardiomiocitos en regeneración y muchos vasos recién formados llenos de células de la sangre en toda la zona del infarto (Figura 6b: 2) en comparación con la sustitución fibrosa en el control (Figura 6b: 1).

**V. Origen celular de los miocardios regenerados después de tratamiento directo con CMF**

Haciendo referencia a la Figura 7, los estudios sobre el modelo de MÍ con sustitución de médula ósea con MSC marcadas con Dil han proporcionado pruebas directas de que el origen celular del miocardio en regeneración procedía de las MSC de médula ósea. Una semana después de la sustitución de la médula ósea, se realizó una cirugía de infarto cardíaco como se ha descrito antes. Catorce días después de un infarto, se encontró que todas las regiones infartadas en corazones tratados con CMF estaban muy ocupadas por células marcadas con Dil, que estaban en gran medida ausentes en regiones no infartadas que tenían los cardiomiocitos viables preexistentes. Estas células positivas a Dil se agruparon adoptando una morfología similar a miocardio, pero de menor tamaño en comparación

con los cardiomiocitos pre-existentes (Figura 7: 1). En contraste, sólo se observaron algunas células positivas a Dil dispersas a lo largo de la zona fronteriza infartada en corazones infartados de control (Figura 7: 2). Para confirmar que estas células positivas a Dil bien organizadas estaban regenerando miocardios, se realizaron ensayos inmunohistoquímicos con anticuerpos específicos para la troponina I y PCNA. Se encontró que numerosas células positivas a Dil distribuidas en toda la zona infartada fueron teñidas positivamente por anticuerpos específicos para la troponina I (Figura 7: 3) o para PCNA (Figura 7: 4). Estas células teñidas positivamente con Dil y troponina I o PCNA se organizaron en tejido similar a miocardio en toda la zona infartada en corazones tratados con CMF (Figura 7: 3 y 4). Bajo un campo de mayor potencia, estos tejidos similares a miocardios en regeneración mostraron la morfología típica del miocardio con una clara conexión de disco intercalado entre los miocitos en regeneración, lo que indica la maduración ultraestructural del miocito en regeneración individual en el miocardio integrado (Figura 7: 5). Sin la integración estructural entre los miocitos en regeneración, y entre el miocardio en regeneración y el miocardio viable pre-existente, no estaría garantizada la integración funcional y la actividad mecánica sincrónica. Estos miocardios en regeneración ocupaban por término medio 69,3% del volumen total infartado el día 14 después del infarto. En contraste, en 6 corazones de control, sólo unas cuantas células fueron tanto positivas a la troponina I como a Dil y estaban dispersas alrededor de los vasos, mientras que la zona infartada estaba ocupada principalmente por la cicatriz fibrosa (Figura 7: 6). Estos resultados demostraron que el miocardio en regeneración inducida por CMF era funcional y procedía de las MSC de la médula ósea.

#### IV Fabricación de composiciones farmacéuticas y su uso en el tratamiento de enfermedades cardíacas isquémicas en mamíferos

Una vez que se identifica el compuesto químico eficaz y se obtienen preparaciones parcial o sustancialmente puras del compuesto ya sea mediante el aislamiento del compuesto a partir de fuentes naturales, tales como plantas o por síntesis química, pueden fabricarse diversas composiciones o formulaciones farmacéuticas a partir del compuesto parcial o sustancialmente puro utilizando procesos existentes o futuros procesos desarrollados en la industria. Los procesos específicos de fabricación de formulaciones farmacéuticas y formas de dosificación (incluyendo, aunque sin limitación, comprimidos, cápsulas, inyecciones, jarabes) a partir de compuestos químicos no son parte de la invención y los expertos en la técnica de la industria farmacéutica serán capaces de aplicar uno o más procesos establecidos en la industria para la práctica de la presente invención. Alternativamente, los expertos en la técnica pueden modificar los procesos convencionales existentes para adaptarse mejor a los compuestos de la presente invención. Por ejemplo, las bases de datos de solicitudes de patentes o de patentes existentes en la página web oficial de la Oficina de Patentes y Marcas de EE.UU. (abreviadamente USPTO por su denominación en inglés *United States Patent and Trademark Office*) contienen ricos recursos respecto a la fabricación de formulaciones y productos farmacéuticos a partir de compuestos químicos eficaces. Otra fuente útil de información es el *Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations* editado por Sarfaraz K. Niazi y vendido por *Culinary & Hospitality Industry Publications Services*.

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones, el término "extracto de planta" significa una mezcla de compuestos de origen natural obtenidos de partes de una planta, en donde al menos el 10% de la masa seca total es de compuestos no identificados. En otras palabras, un extracto de planta no comprende un compuesto identificado, sustancialmente purificado de la planta. El término "excipiente farmacéutico" significa un ingrediente contenido en una formulación farmacéutica que no es un constituyente medicinalmente activo. El término "una cantidad eficaz" se refiere a la cantidad que es suficiente para provocar un efecto terapéutico en el sujeto tratado. La cantidad eficaz variará, reconocerán los expertos en la técnica, dependiendo de los tipos de enfermedades tratadas, la vía de administración, el uso de excipientes y la posibilidad de uso conjunto con otros tratamientos terapéuticos. Un experto en la técnica puede determinar una cantidad eficaz en una situación particular.

#### Referencias

1. Orlic, D. et al., *Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium*. *Nature* 410, 701-5 (2001).
2. Toma, C., Pittenger, M. F., Cahill, K. S., Byrne, B. J. & Kessler, P.D. *Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart*. *Circulation* 105, 93-8 (2002).
3. Tomita, S. et al., *Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function*. *Circulation* 100, 11247-56 (1999).
4. Beltrami, A. P., et al. *Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction*. *N. Engl. J. Med.* 344, 1750-7 (2001).
5. Kajstura, J. et al., *Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95, 8801-5 (1998).
6. Laugwitz, K. L., et al., *Postnatal ISL1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages*. *Nature* 433, 647-53 (2005).
7. Leferovich, J. M. et al., *Heart regeneration in adult MRL mice*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 9830-5 (2001).

8. Poss, K. D., Wilson, L. G. & Keating, M. T. *Heart regeneration in zebrafish. Science* 298, 2188-90 (2002).

9. Reinecke, H., Zhang, M., Bartosek, T. & Murry, C. E., *Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: a study in normal and injured rat hearts. Circulation* 100, 193-202 (1999).

5 10. Taylor, D. A., et al., *Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. Nat. Med.* 4, 929-33 (1998).

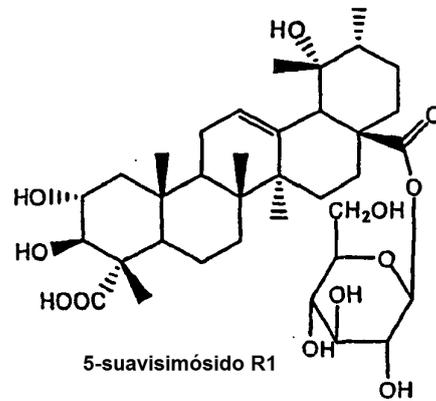
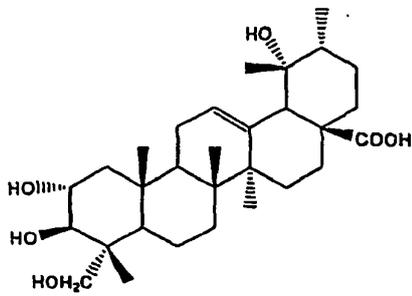
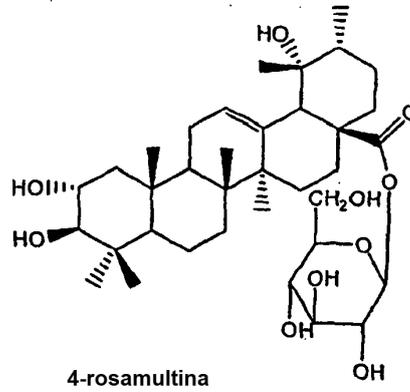
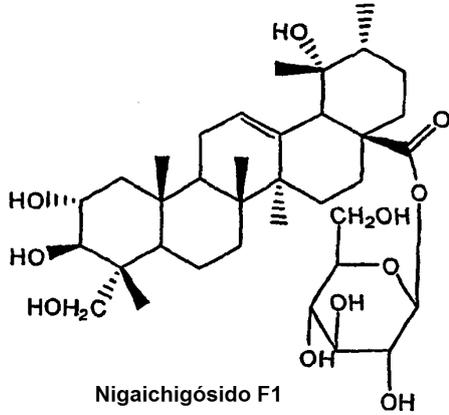
11. Yoo, K. J. et al., *Heart cell transplantation improves heart function in dilated cardiomyopathic hamsters. Circulation* 102, III204-9 (2000).

12. Mangi, A. A., et al., *Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. Nat. Med.* 9, 1195-201 (2003).

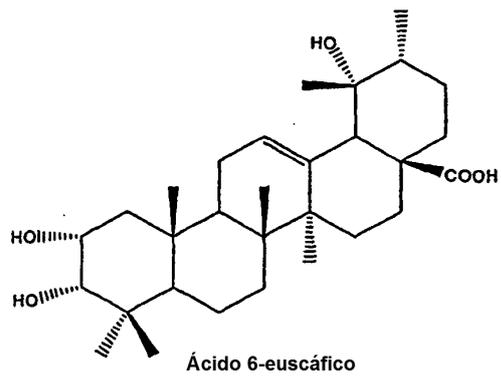
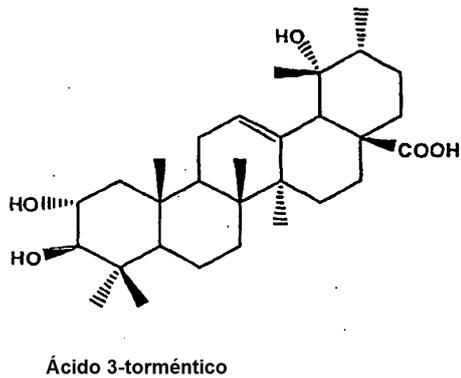
10

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto aislado a partir de fuentes naturales u obtenido por síntesis química, seleccionado del grupo que consiste en:

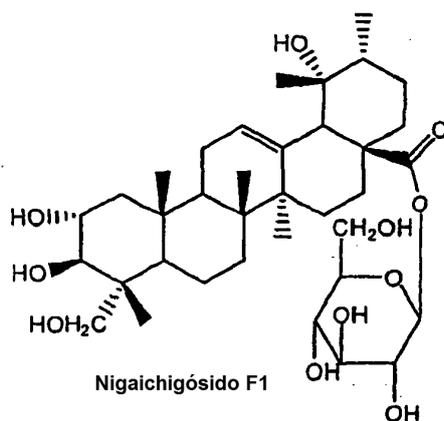


5

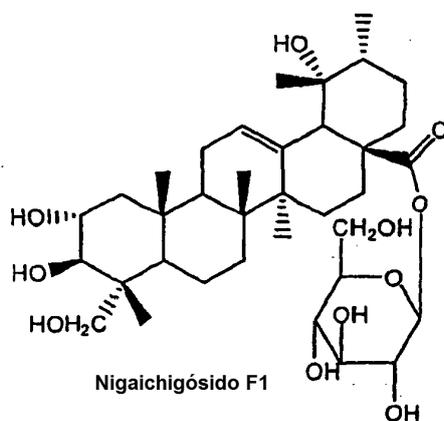


10 en la fabricación de un medicamento para tratar el infarto de miocardio en un sujeto mamífero por regeneración de los cardiomiocitos.

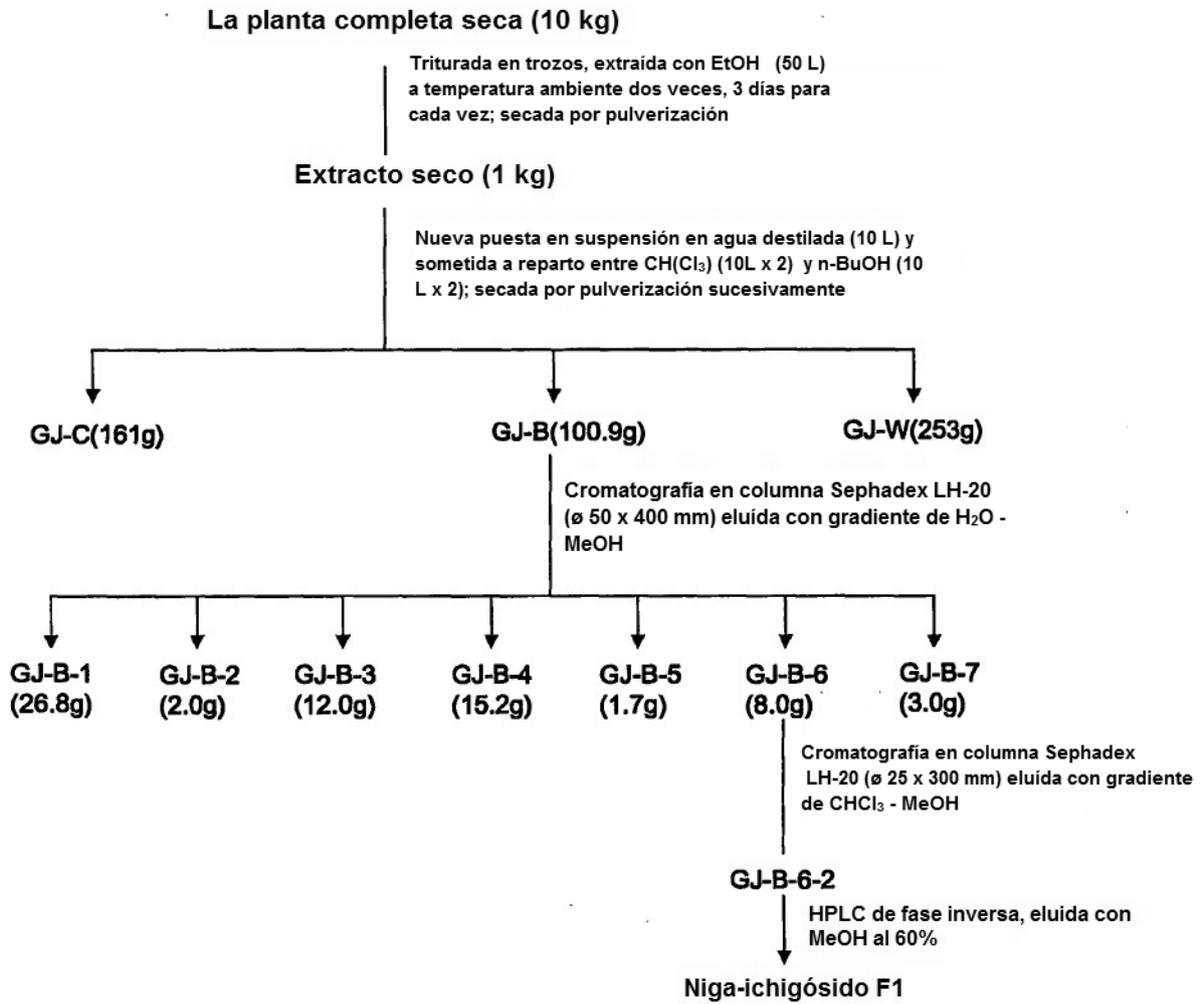
2. Uso según la reivindicación 1, en el que dicho compuesto es:



3. 5      Usó según la reivindicación 1, en el que el compuesto regenera miocitos en un proceso que comprende una o más etapas de (a): aumentar la viabilidad de las células precursoras miogénicas, que no proceden de embriones humanos, para permitir que dichas células precursoras sobrevivan durante un período de isquemia absoluta; (b) reconstituir un retículo de suministro de sangre dañada en dicha región del corazón en la que se encuentra dicho músculo lesionado, y (c) mejorar la eficacia de la diferenciación cardiomiogénica de dichas células precursoras hasta la de un linaje cardíaco, realizándose dichas etapas simultáneamente o en cualquier orden en particular.
- 10     4.      Usó según la reivindicación 3, en el que dichas células precursoras miogénicas son células madre +++ mesenquimatosas (MSC) provenientes de la médula ósea a través de la circulación sanguínea.
- 15     5.      Usó según la reivindicación 3, en el que dicha regeneración comprende además las etapas de: (a) obtener células madre mesenquimatosas que no procedan de embriones humanos; (b) poner en contacto dichas células madre con dicho compuesto o dicho derivado funcional durante cierto periodo de tiempo; y (c) trasplantar dichas células a un tejido cardíaco infartado o dañado de dicho sujeto mamífero.
- 20     6.      Usó según la reivindicación 3, en el que dicha regeneración comprende además las etapas de: (a) cultivar una pluralidad de células madre mesenquimatosas, que no procedan de embriones humanos, o células endoteliales en un medio de cultivo que contiene dicho compuesto o dicho derivado funcional durante cierto periodo de tiempo; (b) recoger dicho medio de cultivo, que contiene proteínas secretoras a partir de dichas células madre mesenquimatosas o células endoteliales, y (c) administrar o suministrar dicho medio a tejidos cardíacos en una zona infartada.
- 25     7.      Un compuesto como se define en la reivindicación 1, aislado de fuentes naturales u obtenido por síntesis química, para su uso en el tratamiento del infarto de miocardio en un sujeto mamífero por regeneración de los cardiomiocitos.
8.      Un compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicho compuesto es:



**FIG. 1**



**FIG. 2**

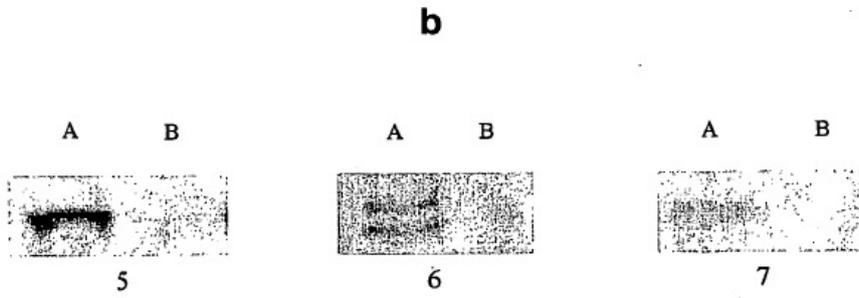
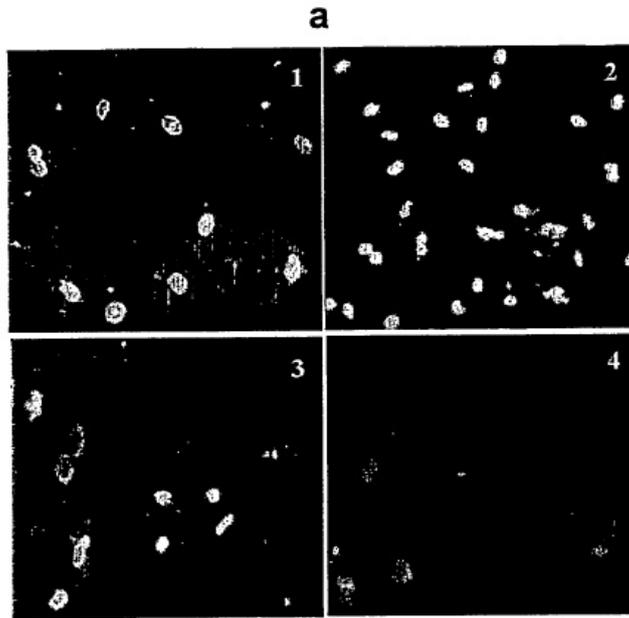


FIG. 3

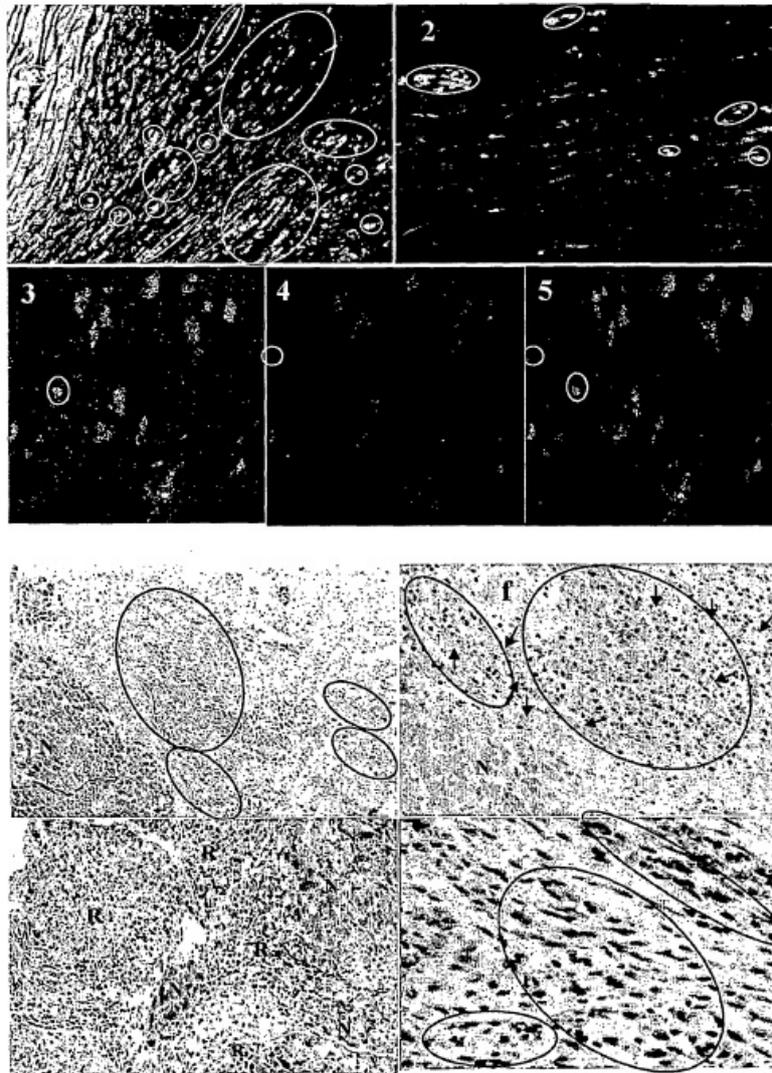


FIG. 4

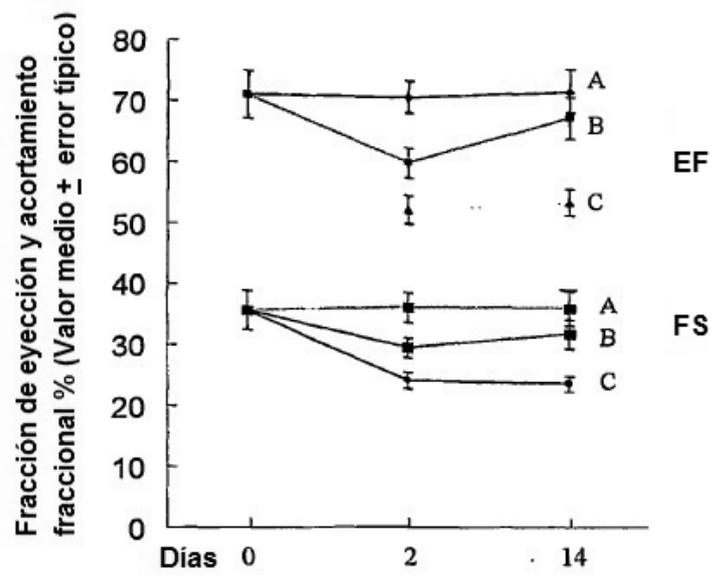


FIG. 5

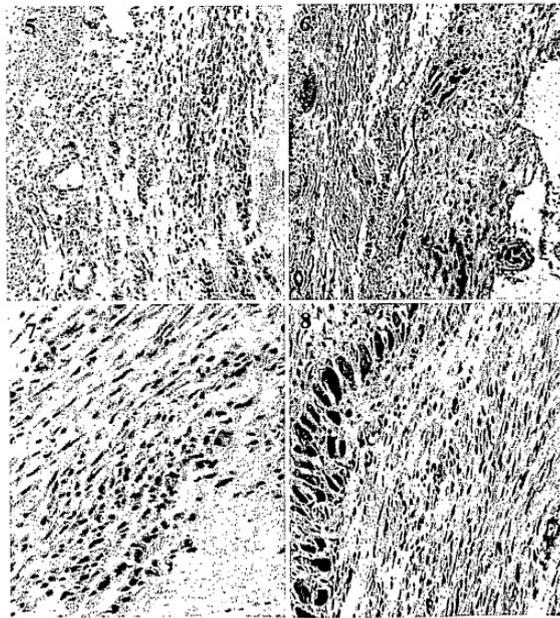
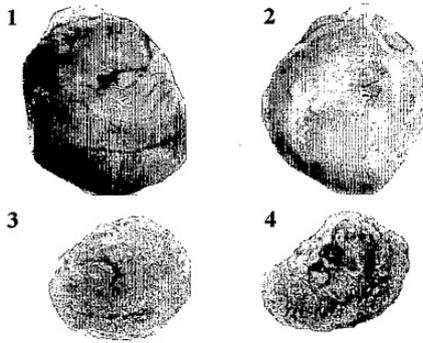
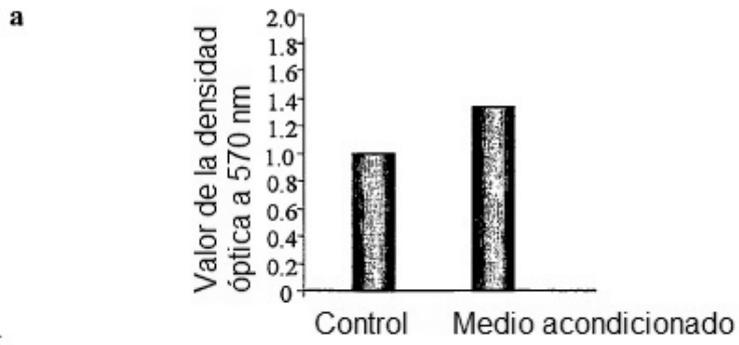


FIG. 6



**b**

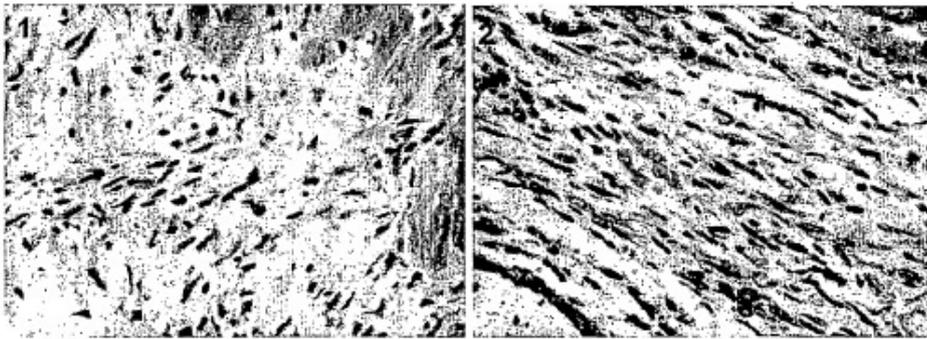


FIG. 7

