

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 118**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2002 E 04023157 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2013 EP 1491093**

54 Título: **Células madre adultas multipotentes, fuentes de estas, métodos para obtenerlas y mantenerlas, métodos de diferenciación de estas, métodos de uso de estas y células derivadas de estas**

30 Prioridad:

14.02.2001 US 268786 P
15.02.2001 US 269062 P
07.08.2001 US 310625 P
25.10.2001 US 343836 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.11.2013

73 Titular/es:

ABT HOLDING COMPANY (50.0%)
3201 Carnegie Avenue
Cleveland, OH 44115, US y
REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA
(50.0%)

72 Inventor/es:

FURCHT, LEO T.;
VERFAILLIE, CATHERINE M. y
REYES, MORAYAMA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 432 118 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

5 Células madre adultas multipotentes, fuentes de estas, métodos para obtenerlas y mantenerlas, métodos de diferenciación de estas, métodos de uso de estas y células derivadas de estas

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere generalmente a células madre adultas multipotentes de mamíferos (CMAM) y más específicamente a métodos para obtener, mantener y diferenciar las CMAM. También se proporcionan usos de CMAM en el tratamiento terapéutico de la enfermedad.

Antecedentes de la invención

15 La generación de un órgano y un tejido a partir de células madre, y su posterior trasplante proporcionan tratamientos prometedores para diferentes patologías, lo que convierte a las células madre en un punto central de investigación en muchos campos. La tecnología de las células madre proporciona una terapia alternativa prometedora para la diabetes, enfermedad de Parkinson, enfermedad hepática, enfermedad cardíaca y trastornos autoinmunitarios, por nombrar unos pocos. Sin embargo, hay al menos dos grandes problemas asociados con el trasplante de órganos y tejidos.

20 En primer lugar, hay escasez de donantes de órganos y tejidos. Tan solo un 5 por ciento de los órganos que se necesitan para trasplantes en los Estados Unidos llega alguna vez a estar disponible para el receptor (Evans et al. 1992). De acuerdo con la Asociación Americana del Corazón, únicamente 2300 de los 40 000 americanos que necesitaron un corazón nuevo en 1997 recibieron uno. La Fundación Americana del Hígado declara que hay menos de 3000 donantes para los cerca de 30 000 pacientes que fallecen cada año debido a la insuficiencia hepática.

25 El segundo gran problema reside en la potencial incompatibilidad del tejido trasplantado con el sistema inmunitario del receptor. Debido a que el sistema inmunitario del receptor reconoce como extraño el órgano o tejido donado es necesario proporcionar al paciente medicamentos inmunosupresores con un coste significativo tanto económico como físico.

30 El xenotrasplante, o el trasplante de órganos o tejidos de otras especies, podrían proporcionar un medio alternativo para superar la escasez de órganos y tejidos humanos. El xenotrasplante ofrecería la ventaja de una planificación avanzada. El órgano se podría extraer cuando todavía está sano y el paciente podría someterse a cualquier tratamiento previo beneficioso antes de la intervención quirúrgica para el trasplante. Desgraciadamente, el xenotrasplante no soluciona el problema de la incompatibilidad tisular, sino que lo exacerba. Además, de acuerdo con los Centros para el Control de Enfermedades, se dispone de evidencia de que los virus dañinos cruzan las barreras entre especies. Los cerdos se han convertido en candidatos probables como donantes de órganos y tejidos, sin embargo, se ha documentado la transmisión entre especies de más de un virus de cerdos a humanos. Por ejemplo, más de un millón de cerdos fueron sacrificados recientemente en Malasia en un esfuerzo por contener un brote del virus Hendra, una enfermedad que fue transmitida a más de 70 humanos con resultados mortales (Butler, D. 1999).

45 Células madre: Definición y uso

La fuente más prometedora de órganos y tejidos para trasplantes, por tanto, reside en el desarrollo de la tecnología de las células madre. En teoría, las células madre pueden llevar a cabo una división celular autorrenovadora para dar lugar a células hija idénticas genotípica y fenotípicamente durante un tiempo indefinido y, finalmente, pueden diferenciarse en al menos un tipo celular final. Mediante la generación de órganos o tejidos a partir de las propias células madre del paciente, o mediante la alteración genética de células heterólogas de modo que el sistema inmunitario del receptor no las reconozca como extrañas, se pueden generar tejidos para trasplantes para proporcionar las ventajas asociadas con el xenotrasplante sin los riesgos asociados de infección o rechazo del tejido.

55 Las células madre también proporcionan la promesa de una mejora en los resultados de la terapia génica. Las propias células madre del paciente se podrían alterar in vitro y a continuación introducir las de nuevo in vivo para producir el producto génico deseado. Estas células madre alteradas genéticamente tendrían el potencial de ser inducidas a diferenciarse para formar una multitud de tipos celulares para su implante en sitios específicos del cuerpo o para una aplicación sistémica. De manera alternativa, las células madre heterólogas podrían alterarse genéticamente para expresar los antígenos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) del receptor, o ningún antígeno del MHC, lo que permitiría el trasplante de células de un donante a un receptor sin el riesgo asociado de rechazo.

65 Se define a las células madre como células que poseen el potencial de una proliferación amplia, se diferencian en varias estirpes celulares y repueblan los tejidos tras el trasplante. La célula madre por excelencia es la célula madre

embrionaria (ME) ya que posee un potencial de diferenciación multipotente y autorrenovador ilimitado (Thomson, J. et al. 1995; Thomson, J.A. et al. 1998; Shambloott, M et al. 1998; Williams, R.L. et al. 1998; Orkin, S. 1998; Reubinoff, B.E. et al. 2000). Estas células se derivan de la masa celular interna del blastocisto (Thomson, J et al. 1995; Thomson, J.A. et al. 1998; Martin, G.R. 1981) o se pueden derivar de las células germinales primordiales a partir de un embrión tras la implantación (células germinales embrionarias o células GE). Se han derivado células ME y GE de ratón y más recientemente también de primates no humanos y humanos. Cuando se introducen en los blastocistos de ratón, las células ME pueden contribuir a todos los tejidos del ratón (animal) (Orkin, S. 1998). Las células ME murinas son por tanto pluripotentes. Cuando se trasplantan en animales que ya han nacido, las células ME y GE pueden generar teratomas, lo cual demuestra de nuevo su multipotencia. Las células ME (y GE) se pueden identificar por la tinción positiva con anticuerpos que detectan los antígenos embrionarios 1 y 4 específicos de la etapa (SSEA, por sus siglas en inglés).

A nivel molecular, las células ME y GE expresan varios factores de transcripción muy específicos para estas células indiferenciadas. Estos incluyen oct-4 y Rex-1 y el receptor del factor inhibidor de la leucemia (R-FIL). Los factores de transcripción sox-2 y Rox-1 se expresan tanto en las células ME como en las células no ME. Oct-4 se expresa en el embrión antes de la gastrulación, en el embrión en la etapa de segmentación temprana, en las células de la masa celular interna del blastocisto y en las células de carcinoma embrionario (CE). En el animal adulto, oct-4 únicamente se encuentra en las células germinales.

Oct-4, en combinación con Rox-1, provoca la activación transcripcional de la proteína con dedo de zinc Rex-1 y también se necesita para mantener las células ME en un estado indiferenciado. El gen oct-4 experimenta una disminución regulada cuando se induce la diferenciación in vitro de las células. Varios estudios han mostrado que se necesita oct-4 para el mantenimiento del fenotipo indiferenciado de las células ME y que desempeña un papel principal en la determinación de las primeras etapas de la embriogénesis y diferenciación. Se necesita sox-2 junto con oct-4 para mantener el estado indiferenciado de las células ME/CE y para mantener las células ME murinas pero no las humanas. Las células germinales primordiales murinas o humanas requieren la presencia de FIL. Otra característica distintiva de las células ME es la presencia de niveles elevados de telomerasa, la cual proporciona a estas células un potencial ilimitado de autorrenovación in vitro.

Se han identificado células madre en la mayor parte de los órganos o tejidos. La mejor caracterizada es la célula madre hematopoyética (CMH). Esta célula derivada del mesodermo se ha purificado basándose en los marcadores de la superficie celular y en características funcionales. La CMH, aislada a partir de la médula ósea (MO), sangre, sangre del cordón umbilical, hígado fetal y saco vitelino, es la célula progenitora que genera los glóbulos sanguíneos o tras la traducción inicia de nuevo varias estirpes hematopoyéticas y puede reiniciar hematopoyesis de por vida en el receptor. (Remítase a Fei, R., et al., patente de los EE. UU. N.º 5.635.387; McGlave, et al., patente de los EE. UU. N.º 5.460.964; Simmons, P., et al., patente de los EE. UU. N.º 5.677.136; Tsukamoto, et al., patente de los EE. UU. N.º 5.750.397; Schwartz, et al., patente de los EE. UU. N.º 5.759.793; DiGuisto, et al., patente de los EE. UU. N.º 5.681.599; Tsukamoto, et al., patente de los EE. UU. N.º 5.716.827; Hill, B., et al. 1996). Cuando se trasplantan en animales o humanos irradiados de manera letal, las CMH pueden regenerar la población celular hemopoyética linfóide, de megacariocitos, de neutrófilos-macrófagos y eritroide. In vitro, se puede inducir a las células madre hematopoyéticas a llevar a cabo al menos algunas divisiones celulares autorrenovadoras y se las puede inducir a diferenciarse en las mismas estirpes que se observan in vivo. Por tanto, esta célula cumple los requisitos de una célula madre. Las células madre que se diferencian únicamente para formar células de la estirpe hematopoyética, sin embargo, son incapaces de proporcionar una fuente de células para reparar otros tejidos dañados, por ejemplo, tejido de pulmón o corazón dañado por una dosis elevada de agentes quimioterapéuticos.

Un segundo tipo de célula madre que se ha estudiado de manera exhaustiva es la célula madre neural (CMN) (Gage F.H. 2000; Svendsen C.N. et al, 1999; Okabe S. et al. 1996). Las CMN se identificaron inicialmente en la zona subventricular y en el bulbo olfativo del cerebro fetal. Hasta hace poco, se creía que el cerebro adulto ya no contenía células con el potencial de las células madre. Sin embargo, varios estudios en roedores, y más recientemente también en primates no humanos y humanos, han mostrado que las células madre continúan estando presentes en el cerebro adulto. Estas células madre pueden proliferar in vivo y regenerar de manera continua al menos algunas células neuronales in vivo. Cuando se cultivan ex vivo, se puede inducir a las CMN a proliferar así como a diferenciarse en diferentes tipos de neuronas y células neurogliales. Cuando se trasplantan en el cerebro, las CMN pueden injertarse y generar células neurales y células neurogliales. Por tanto, esta célula también se ajusta a la definición de una célula madre, aunque sea una célula madre hematopoyética.

Clarke et al. señalaron que las CMN de ratones transgénicos Lac-Z inyectadas en blastocistos murinos o embriones de pollo contribuían a varios tejidos del embrión de pollo o ratón quimérico (Clarke, D.L. et al. 2000). Se detectaron células que expresan LacZ con un grado variable de mosaicismo, no solamente en el sistema nervioso central, sino también en los derivados del mesodermo así como en las células epiteliales del hígado e intestino pero no en otros tejidos, incluido el sistema hematopoyético. Estos estudios, por tanto, sugieren que las CMN adultas pueden poseer un potencial de diferenciación significativamente mayor de lo que se pensaba anteriormente pero todavía no poseen la capacidad pluripotente de las células ME o de las células madre adultas multipotentes derivadas de adultos (CMAM) descritas en Furcht et al. (WO 01/11011) y en la presente. Los términos MAPC, MPC (ambas por sus siglas

en inglés) y CMAM también se pueden emplear indistintamente para describir células madre adultas multipotentes derivadas de adultos.

Las terapias para los trastornos cerebrales traumáticos y degenerativos se podrían impulsar significativamente con las terapias de reemplazo celular. Se han identificado CMN en la zona subventricular (ZSV) y el hipocampo del cerebro de mamíferos adultos (Ciccolini et al., 1998; Morrison et al., 1999; Palmer et al., 1997; Reynolds y Weiss, 1992; Vescovi et al., 1999) y también pueden estar presentes en el epéndimo y otras áreas del cerebro que se consideran no neurogénicas (Doetsch et al., 1999; Johansson et al., 1999; Palmer et al., 1999). Las CMN derivadas de cerebro adulto o fetal se pueden expandir ex vivo e inducir su diferenciación en astrocitos, oligodendrocitos y neuronas funcionales (Ciccolini et al., 1998; Johansson et al., 1999; Palmer et al., 1999; Reynolds et al., 1996; Ryder et al., 1990; Studer et al., 1996; Vescovi et al., 1993). In vivo, las CMN indiferenciadas cultivadas durante períodos variables de tiempo se diferencian en células neurogliales, neuronas dopaminérgicas y GABAérgicas (Flax et al., 1998; Gage et al., 1995; Suhonen et al., 1996). La fuente de CMN utilizada más comúnmente es el cerebro fetal alogénico, el cual presenta problemas tanto éticos como inmunitarios. De manera alternativa, se pueden recolectar CMN del cerebro autólogo. Debido a que no se sabe si una patología neural preexistente afectará la capacidad de las CMN para ser cultivadas e inducidas a diferenciarse en células neurogliales y neuronales ex vivo, y debido a que una cirugía adicional en un cerebro que ya está enfermo puede agravar la enfermedad subyacente, esta estrategia es menos atractiva.

La fuente ideal de neuronas y neuroglía para las estrategias de reemplazo serían células que se puedan extraer de tejidos autólogos adultos diferentes del cerebro que sean fácilmente accesibles y que se puedan expandir in vitro y diferenciar ex vivo o in vivo en el tipo celular que es deficiente en el paciente. Informes recientes han sugerido que las células derivadas de la MO adquieren características fenotípicas de las células neuroectodérmicas cuando se cultivan in vitro en condiciones de las CMN o cuando entran en el sistema nervioso central (Sanchez-Ramos et al., 2000; Woodbury et al., 2000). No se conoce el fenotipo de las células de la MO con esta capacidad. Tampoco se conoce la capacidad de diferenciación en otros tipos celulares de las células que adquieren características neuroectodérmicas.

Una tercera célula histoespecífica con propiedades de célula madre es la célula madre mesenquimatosa (CMM), descrita inicialmente por Fridenshtein (1982). La CMM, derivada originalmente del mesodermo embrionario y aislada de MO de adultos, se puede diferenciar para formar músculo, hueso, cartílago, grasa, estroma medular y tendón. Durante la embriogénesis, el mesodermo se desarrolla para dar el mesodermo dorsal somítico, tejido que genera el hueso, cartílago, grasa, músculo esquelético y posiblemente el endotelio. El mesodermo también se diferencia en el mesodermo visceral, el cual da lugar al músculo cardíaco, músculo liso o islotes sanguíneos constituidos por el endotelio y las células progenitoras hematopoyéticas. Las CMM o células del mesodermo primitivo, por tanto, podrían proporcionar una fuente de diferentes tipos tisulares y celulares. Se han aislado varias CMM. (Remítase a, por ejemplo, Caplan, A., et al., patente de los EE. UU. N.º 5.486.359; Young, H., et al., patente de los EE. UU. N.º 5.827.735; Caplan, A., et al., patente de los EE. UU. N.º 5.811.094; Bruder, S., et al., patente de los EE. UU. N.º 5.736.396; Caplan, A., et al., patente de los EE. UU. N.º 5.837.539; Masinovsky, B., patente de los EE. UU. N.º 5.837.670; Pittenger, M., patente de los EE. UU. N.º 5.827.740; Jaiswal, N., et al., 1997; Cassiede P., et al., 1996; Johnstone, B., et al., 1998; Yoo, et al., 1998; Gronthos, S., 1994).

De las muchas CMM que se han descrito, todas han mostrado una diferenciación limitada para formar células consideradas generalmente de origen mesenquimatoso. Hasta la fecha, la CMM más multipotente descrita es la célula aislada por Pittenger et al., la cual expresa el fenotipo SH2⁺ SH4⁺ CD29⁺ CD44⁺ CD71⁺ CD90⁺ CD106⁺ CD120a⁺ CD124⁻ CD 14⁻ CD34⁻ CD45⁻. Esta célula es capaz de diferenciarse para formar varios tipos celulares de origen mesenquimatoso, pero aparentemente posee un potencial limitado de diferenciación en células de la estirpe mesenquimatosa, ya que el equipo que la aisló señaló que nunca se identificaron células hematopoyéticas en los cultivos expandidos (Pittenger et al., 1999).

Se han identificado otras células madre histoespecíficas, incluidas las células madre gastrointestinales (Potten, C. 1998), células madre epidérmicas (Watt, F. 1997) y células madre hepáticas, también denominadas células ovales (Alison, M. et al., 1998). La mayoría de estas están peor caracterizadas.

Comparadas con las células ME, las células madre histoespecíficas poseen una capacidad de autorrenovación menor y, aunque se diferencian en múltiples estirpes, no son pluripotentes. Ningún estudio ha abordado si las células histoespecíficas expresan los marcadores descritos anteriormente como se ha observado en las células ME. Además, el grado de actividad telomerasa en las células comprometidas con una estirpe o histoespecíficas no se ha explorado completamente, en parte debido a que es difícil obtener números elevados de poblaciones muy enriquecidas de estas células.

Hasta hace poco, se pensaba que las células madre histoespecíficas únicamente podían diferenciarse en células del mismo tejido. Varias publicaciones recientes han sugerido que las células madre adultas específicas de un órgano pueden ser capaces de diferenciarse en células de diferentes tejidos. Sin embargo, no se ha comprendido completamente la verdadera naturaleza de estos tipos de células. Varios estudios han mostrado que las células trasplantadas en el momento de un trasplante de MO pueden diferenciarse en músculo esquelético (Ferrari, 1998;

Gussoni, 1999). Se podría considerar que esto significa un posible potencial de diferenciación de las células mesenquimatosas que están presentes en la médula. Jackson publicó que las células satélite musculares se pueden diferenciar en células hematopoyéticas, de nuevo un cambio en el fenotipo en el mesodermo esplácnico del embrión (Jackson, 1999). Otros estudios han mostrado que las células madre de una capa embrionaria (por ejemplo, el mesodermo esplácnico) se pueden diferenciar en tejidos que se creían derivados durante la embriogénesis de una capa embrionaria diferente. Por ejemplo, las células endoteliales o sus precursores detectados en humanos o animales que se sometieron a un trasplante de médula se derivan, al menos en parte, de la médula del donante (Takahashi, 1999; Lin, 2000). Por tanto, las capacidades del mesodermo visceral pero no del mesodermo esplácnico tales como la progenie derivada de las CMM, se transfieren junto con la médula infundida. Incluso más sorprendentes son los informes que demuestran, tanto en roedores como en humanos, que las células epiteliales hepáticas y las células epiteliales del conducto biliar se pueden observar en componentes que se derivan de la médula del donante (Petersen, 1999; Theise, 2000; Theise, 2000). De modo similar, tres grupos han mostrado que las CMN se pueden diferenciar en células hematopoyéticas. Finalmente, Clarke et al., publicaron que las células denominadas CMN cuando se inyectan en los blastocistos pueden contribuir a todos los tejidos del ratón quimérico (Clarke et al., 2000).

Es necesario destacar que la mayoría de estos estudios no han demostrado de manera concluyente que una única célula se pueda diferenciar en tejidos de diferentes órganos. También, las células madre aisladas a partir de un órgano dado puede que no sean necesariamente células comprometidas con una estirpe. De hecho, la mayor parte de los investigadores no identificaron el fenotipo de la célula iniciadora. Una excepción es el estudio de Weissman y Grompe, quienes mostraron que las células que repueblan el hígado estaban presentes en células medulares Lin Thy₁LowSca₁⁺, las cuales están muy enriquecidas en CMH. De modo similar, el grupo de Mulligan mostró que las células Sp medulares, muy enriquecidas en CMH, se pueden diferenciar en músculo y endotelio, y Jackson et al. mostraron que las células Sp musculares son responsables de la reconstitución hemopoyética (Gussoni et al., 1999).

El trasplante de órganos y tejidos generados a partir de células ME heterólogas requiere que las células se modifiquen genéticamente de manera adicional para inhibir la expresión de ciertos marcadores de la superficie celular o que se continúen usando supresores inmunitarios quimioterapéuticos con el fin de proteger contra el rechazo al trasplante. Por tanto, aunque la investigación en células ME proporciona una solución alternativa prometedora al problema del suministro limitado de órganos para trasplantes, los problemas y riesgos asociados con la necesidad de la inmunosupresión para mantener el trasplante de tejido o células heterólogas seguirían existiendo. Se estima que se necesitaría establecer 20 líneas de células ME diferentes inmunológicamente para poder proporcionar células inmunocompatibles para las terapias dirigidas a la mayoría de la población.

La utilización de células del individuo desarrollado, antes que de un embrión, como fuente de células madre alogénicas compatibles con un histotipado o células autólogas, podría mitigar o solucionar el problema de la incompatibilidad tisular asociada con el uso de células ME trasplantadas, así como resolver el problema ético asociado con la investigación con células ME. Hasta el momento, la mayor desventaja asociada con el uso de células madre autólogas para el trasplante de tejido reside en su potencial de diferenciación relativamente limitado. Se han aislado varias células madre a partir de organismos totalmente desarrollados, particularmente humanos, pero estas células, aunque se ha publicado que son multipotentes, han demostrado un potencial limitado para diferenciarse en múltiples tipos celulares.

Por tanto, a pesar de que previamente otros y los presentes inventores hayan aislado células madre con un potencial de diferenciación múltiple, no se ha descrito una célula progenitora con el potencial de diferenciarse en una amplia variedad de tipos celulares de diferentes estirpes, que incluya las células hemopoyéticas, de músculo cardíaco, músculo liso, estroma, endotelio, músculo esquelético, adipocitos, condrocitos, osteoblastos, fibroblastos y hepáticas. Si el trasplante de tejidos y células y la terapia génica van a proporcionar los avances terapéuticos esperados, se necesita una célula madre o célula progenitora con un potencial de diferenciación mayor o más amplio. Lo que se necesita es el equivalente adulto de una célula ME.

La MO, el músculo y el cerebro son los tres tejidos en los que se han identificado células con una plasticidad aparentemente mayor de lo que se suponía previamente. La MO contiene células que pueden contribuir a varias estructuras del mesodermo (Ferrari G. et al., 1998; Gussoni E. et al., 1999; Rafii S. et al., 1994; Asahara T. et al., 1997; Lin Y. et al., 2000; Orlic D. et al., 2001; Jackson K. et al., 2001), endodermo (Petersen B.E. et al., 1999; Theise, N.D. et al., 2000; Lagasse E. et al., 2000; Krause D. et al., 2001), neuroectodermo (Mezey D.S. et al., 2000; Brazelton T.R., et al., 2000; Sanchez-Ramos J. et al., 2000; Kopen G. et al., 1999) y de la piel (Krause, D. et al., 2001). Las células del músculo pueden contribuir al sistema hematopoyético (Jackson K. et al., 1999; Seale P. et al., 2000). También se dispone de evidencia de que las CMN pueden diferenciarse en células hematopoyéticas (Bjornson C. et al., 1999; Shih C. et al., 2001), mioblastos de músculo liso (Tsai R. Y. et al., 2000) y que las CMN dan lugar a varios tipos celulares cuando se inyectan en un blastocisto de ratón (Clarke, D.L. et al., 2000).

El documento WO 95/03062 describe métodos y composiciones para prevenir el rechazo inmunitario de injertos de órganos sólidos.

Erices et al., (2000), British Journal of Haematology: 109, 235-242 describe células progenitoras mesenquimatosas en sangre del cordón umbilical humano.

5 El documento WO 02/36751 describe células madre somáticas sin restricciones derivadas de la sangre del cordón umbilical humano.

10 El presente estudio demuestra que se pueden aislar células con características progenitoras adultas multipotentes en un cultivo a partir de varios órganos diferentes, concretamente MO, músculo y cerebro. Las células poseen la misma morfología, fenotipo, capacidad de diferenciación in vitro y poseen un perfil de genes expresado muy similar.

10 **Compendio de la invención**

La invención se expone en las reivindicaciones.

15 La presente invención se refiere a un método para obtener una población de células madre adultas multipotentes (CMAM) aisladas a partir de un mamífero, preferentemente un ratón, rata o humano. La célula se deriva de un órgano o tejido no embrionario y posee la capacidad de ser inducida a diferenciarse para formar al menos un tipo celular diferenciado de origen mesodérmico, ectodérmico y endodérmico. El órgano o tejido a partir del cual se
20 aíslan las CMAM es la sangre del cordón umbilical o la placenta.

25 Algunos ejemplos de células diferenciadas que se pueden derivar de las CMAM son los osteoblastos, condrocitos, adipocitos, fibroblastos, estroma medular, músculo esquelético, músculo liso, músculo cardíaco, oculares, endoteliales, epiteliales, hepáticas, pancreáticas, hematopoyéticas, neurogliales, neuronales u oligodendrocitos. Se puede inducir la diferenciación in vivo o ex vivo.

30 La CMAM producida por el método de la presente invención también se resume como una célula que expresa de manera constitutiva oct4 y niveles elevados de telomerasa, y es negativa para la expresión del MHC de clase II, MHC de clase I y CD44. Como un método de tratamiento, esta célula se administra a un paciente en una cantidad terapéuticamente eficaz. Un beneficio sorprendente de este tratamiento es que no se forman teratomas in vivo.

35 Se describen animales no humanos normales que comprenden CMAM. Preferentemente el animal es quimérico.

También se describe una composición que comprende una población de CMAM y un medio de cultivo que expande la población de las CMAM. En algunos casos es beneficioso que el medio contenga factor de crecimiento epidérmico (FCE), factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP) y factor inhibidor de la leucemia (FIL).

40 Además se describe una composición que comprende una población de una progenie de CMAM total o parcialmente purificada. La progenie puede poseer la capacidad de ser diferenciada adicionalmente o puede estar totalmente diferenciada

45 La progenie puede ser de los siguientes tipos celulares: de oligodendrocitos, neuronal, neuroglial, hematopoyética, pancreática, hepática, epitelial, endotelial, ocular, de músculo cardíaco, de músculo liso, de músculo esquelético, de estroma medular, de fibroblastos, adipocitos, condrocitos u osteoblastos.

50 La presente invención también proporciona un método para aislar y propagar CMAM obteniendo tejido de un mamífero, estableciendo una población de células adherente, eliminando la población de células CD45⁺, recuperando las células CD45⁻ y cultivándolas en condiciones de expansión para producir una población celular expandida. Un objeto de la presente invención, por tanto, es producir una población celular expandida obtenida por este método.

55 Un aspecto de la invención consiste en un método para diferenciar CMAM ex vivo mediante su aislamiento y propagación, y a continuación el cultivo de las células propagadas en presencia de los factores de diferenciación deseados. Los factores de diferenciación preferidos son el factor de crecimiento de fibroblastos básico (FCFb), factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV), sulfuro de dimetilo (DMSO) e isoproterenol; o factor de crecimiento de fibroblastos 4 (FCF4) y factor de crecimiento de hepatocitos (FCH). La propia célula diferenciada también se describe.

60 Se describe un método para diferenciar CMAM in vivo mediante su aislamiento y expansión y, a continuación, la administración de la población celular expandida a un receptor mamífero, donde dicha población celular se injerta y diferencia in vivo en células histoespecíficas, de modo que la función de una célula u órgano defectuosos debido a una lesión, enfermedad genética, enfermedad adquirida o tratamientos yatrógenos, se aumenta, reconstituye o proporciona por primera vez. Utilizando este método, la CMAM puede experimentar autorrenovación in vivo.

65 También se describe una célula diferenciada obtenida por diferenciación ex vivo o in vivo. La célula diferenciada puede ser de ectodermo, mesodermo o endodermo. La célula diferenciada puede ser de los siguientes tipos celulares: de oligodendrocitos, neuronal, neuroglial, hematopoyética, pancreática, hepática, epitelial, endotelial,

ocular, de músculo cardíaco, de músculo liso, de músculo esquelético, de estroma medular, de fibroblastos, adipocitos, condrocitos u osteoblastos.

Una aplicación importante de esta tecnología es el método para tratar a un paciente mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de CMAM o su progenie. La progenie puede poseer la capacidad de ser diferenciada adicionalmente o puede estar totalmente diferenciada. Un beneficio inesperado de este enfoque es que se reduce o elimina la necesidad de tratamiento previo y/o tratamiento posterior del paciente con irradiación, quimioterapia, agentes inmunosupresores u otros fármacos o tratamientos. Tampoco se requiere la inducción de la tolerancia antes o durante el tratamiento.

Un tratamiento de este tipo puede tratar diferentes enfermedades y afecciones, incluidos el cáncer, la enfermedad cardiovascular, enfermedad metabólica, enfermedad hepática, diabetes, hepatitis, hemofilia, afecciones neurológicas traumáticas o degenerativas, enfermedad autoinmunitaria, deficiencia genética, trastornos del tejido conectivo, anemia, enfermedad infecciosa y rechazo del trasplante.

Las CMAM o su progenie se administran a través de una inyección localizada, incluida la administración por catéter, inyección sistémica, administración parenteral, administración oral o inyección intrauterina en un embrión. La administración puede ser en combinación con una matriz farmacéuticamente aceptable, la cual puede ser biodegradable.

Las CMAM o su progenie administradas a un paciente alteran el sistema inmunitario para resistir la infección fúngica, bacteriana o vírica.

Sorprendentemente, no se forman teratomas cuando las CMAM o su progenie se administran a un paciente.

Cuando se administran a un paciente, las CMAM o su progenie también son capaces de aumentar, reconstituir o proporcionar por primera vez la función de una célula u órgano defectuosos debido a una lesión, enfermedad genética, enfermedad adquirida o tratamientos yatrógenos. El órgano puede ser cualquiera de los siguientes: médula ósea, sangre, bazo, hígado, pulmón, tracto intestinal, cerebro, sistema inmunitario, sistema circulatorio, hueso, tejido conectivo, músculo, corazón, vasos sanguíneos, páncreas, sistema nervioso central, sistema nervioso periférico, riñón, vejiga, piel, apéndices epiteliales, glándulas mamarias del pecho, tejido graso y superficie de las mucosas incluidas la bucal, esofágica, vaginal y anal. Algunos ejemplos de enfermedades tratables por este método son el cáncer, enfermedad cardiovascular, enfermedad metabólica, enfermedad hepática, diabetes, hepatitis, hemofilia, afecciones neurológicas traumáticas o degenerativas, enfermedad autoinmunitaria, deficiencia genética, trastornos del tejido conectivo, anemia, enfermedad infecciosa y rechazo del trasplante.

Las CMAM o su progenie se dirigen a uno o más órganos en el paciente y se injertan en estos de modo que la función de una célula u órgano defectuosos debido a una lesión, enfermedad genética, enfermedad adquirida o tratamientos yatrógenos se aumenta, reconstituye o proporciona por primera vez, lo cual es sorprendente e inesperado. En una realización preferida, la lesión es isquemia o inflamación.

Las CMAM o su progenie pueden promover la angiogénesis.

Las CMAM o su progenie puede transformarse genéticamente para suministrar un agente terapéutico, preferentemente un agente antiangiogénico.

Se describe una composición terapéutica que comprende CMAM y un portador farmacéuticamente aceptable, donde las CMAM están presentes en una cantidad eficaz para producir tejido seleccionado del grupo constituido por médula ósea, sangre, bazo, hígado, pulmón, tracto intestinal, cerebro, sistema inmunitario, hueso, tejido conectivo, músculo, corazón, vasos sanguíneos, páncreas, sistema nervioso central, riñón, vejiga, piel, apéndices epiteliales, glándulas mamarias del pecho, tejido graso y superficie de las mucosas incluidas la bucal, esofágica, vaginal y anal.

También se describe un método terapéutico para restaurar la función de la célula, tejido u órgano en un paciente que comprende los pasos de extraer CMAM de un mamífero donante, expandir las CMAM para formar una población expandida de células indiferenciadas y administrar las células expandidas al paciente y donde se restaura la función de la célula, tejido u órgano. La función restaurada puede ser enzimática o genética. El mamífero donante puede ser el paciente.

Se describe un método para inhibir el rechazo de una CMAM heteróloga trasplantada en un paciente, que comprende los pasos de introducir en la CMAM, ex vivo, un secuencia de ácido nucleico que codifica el antígeno del MHC del receptor ligado operablemente a un promotor, donde la CMAM expresa el antígeno del MHC, y trasplantar la CMAM al paciente, donde el antígeno del MHC se expresa en un nivel suficiente para inhibir el rechazo de la CMAM trasplantada. El paciente es de la misma especie que el donante de la CMAM o de otra especie de mamíferos.

Un método alternativo para inhibir el rechazo de una CMAM heteróloga trasplantada en el paciente comprende inhibir transgénicamente la expresión del antígeno del MHC en la CMAM y trasplantar la CMAM transgénica en el paciente, la célula CMAM no expresa el antígeno del MHC y se evita el rechazo de las células trasplantadas.

5 También se describe un método para generar sangre o componentes sanguíneos individuales ex vivo mediante el proceso de aislar CMAM y diferenciar la CMAM para generar sangre o componentes sanguíneos. Preferentemente, los componentes sanguíneos individuales son eritrocitos, leucocitos o plaquetas.

10 Adicionalmente se describe un método de descubrimiento de fármacos que comprende los pasos de analizar la composición genómica o proteómica de las CMAM o de su progenie, emplear el análisis de estos a través de análisis informáticos y/o bioinformáticos utilizando algoritmos y ensamblar y comparar datos nuevos con bases de datos conocidas para comparar y contrastar estos.

15 También se describe un método para identificar los componentes de una ruta de diferenciación que comprende los pasos de analizar la composición genómica o proteómica de las CMAM, inducir la diferenciación de las CMAM in vitro o in vivo, analizar la composición genómica o proteómica de las células intermediarias de la ruta de diferenciación, analizar la composición genómica o proteómica de las células totalmente diferenciadas de la ruta de diferenciación, utilizando algoritmos y/o herramientas bioinformáticas para caracterizar la composición genómica o proteómica de las CMAM y su progenie, y comparar los datos obtenidos en (e) para identificar los componentes de la ruta. Utilizando este método, se puede comparar la diferenciación que tiene lugar in vitro con la diferenciación que tiene lugar in vivo de modo que se pueden caracterizar las diferencias fundamentales entre los dos sistemas.

20 Además se describe un método para generar, in vitro, productos que poseen utilidad terapéutica, diagnóstica o investigadora identificando los productos en las CMAM y aislando los productos de las CMAM. Los productos pueden ser proteínas, lípidos, carbohidratos complejos, ADN o ARN.

25 También se describe un método para inducir en un mamífero tolerancia a un antígeno administrado a dicho mamífero, donde el método comprende el paso de administrar a dicho mamífero, después de o simultáneamente a la administración de dicho antígeno, una cantidad eficaz de las CMAM o su progenie de modo que se suprime la respuesta inmunitaria humoral de dicho mamífero a una provocación posterior con dicho antígeno.

30 Se describe un método para eliminar toxinas de la sangre de un paciente que comprende poner en contacto sangre ex vivo con células derivadas de las CMAM, donde dichas células recubren un dispositivo basado en fibra hueca. Las células pueden ser células hepáticas o renales.

35 Adicionalmente se describe un método para suministrar productos terapéuticos a un paciente que comprende poner en contacto la sangre de dicho paciente ex vivo con CMAM o su progenie, donde dichas CMAM o su progenie se han transformado genéticamente para suministrar un agente terapéutico, junto con un método para evaluar la toxicidad de un fármaco que comprende poner en contacto las CMAM o su progenie ex vivo con dicho fármaco y monitorizar la supervivencia de la célula. Se puede seleccionar la progenie del grupo constituido por células renales, epiteliales, endoteliales y hepáticas.

Breve descripción de los dibujos

45 La siguiente descripción detallada, proporcionada a modo de ejemplo, pero que no pretende limitar la invención a las realizaciones específicas descritas, puede entenderse en conjunto con los dibujos que la acompañan, en los cuales:

50 La Fig. 1 muestra una ilustración gráfica del potencial de expansión de CMAM derivadas del cerebro, músculo y médula ósea (MO).

La Fig. 2 muestra gráficas de dispersión que representan la expresión génica en (A) CMAM de músculo y cerebro y (B) CMAM de músculo y médula ósea.

55 La Fig. 3 muestra una ilustración gráfica del análisis FACS de CMAM indiferenciadas y CMAM cultivadas con FCEV. Las gráficas muestran el perfil de tinción de IgG de control isotópico (línea fina) vs. el perfil de tinción de un anticuerpo específico (línea gruesa). El panel A muestra el fenotipo de CMAM indiferenciadas. Las CMAM expresan niveles bajos de microglobulina β_2 , Flk1, Flt1 y AC 133, pero no se tiñen con ningún otro de los marcadores antiendoteliales; el panel B muestra el fenotipo de CMAM cultivadas durante 14 días con 10 ng/mL de FCEV. Las CMAM expresan niveles bajos de la mayoría de los marcadores asociados con las células endoteliales pero pierden la expresión de AC 133; y el panel C muestra el fenotipo de CMAM cultivadas durante 3-9 días con 10 ng/mL de FCEV. En el día 3 del cultivo con FCEV las CMAM han perdido la expresión de AC 133, en el día 3 han adquirido la expresión de Tek y VE-cadherina y en el día 9 de Tie, vWF, CD34 y HIP 12.

65 La Fig. 4 muestra una microfotografía de un injerto y diferenciación in vivo de CMAMr. Se examinaron las preparaciones por microscopía confocal o de fluorescencia. Los paneles A, G, J, N, Q y S representan tejidos de control teñidos de manera idéntica de animales NOD-SCID a los que no se les inyectaron CMAMr. Los paneles A-F

muestran una fotomicrografía de médula ósea (MO), obtenidas por centrifugación con una cytospin de un control (A) y un animal de estudio (B-F), teñida con un anticuerpo anti β -gal-FITC y anticuerpos conjugados con PE que reconocen varios antígenos hematopoyéticos. A-B: CD45, C: CD19, D: MAC1, E: GR1, F: TER119 y DAPI; los paneles G-I muestran una fotomicrografía de un corte de bazo de un animal de control (G) y de estudio (H, I) teñido con un anticuerpo anti- β -gal-FITC y un anticuerpo anti-CD45-PE. Las células anti- β -gal⁺ derivadas del donante se observan en agrupaciones. H e I son ampliificaciones 10X y 60X respectivamente; los paneles J-M muestran una fotomicrografía de un corte de hígado de un ratón de control (J) y un animal de estudio (K-M) teñido con anti- β -gal-FITC. J-L están teñidos conjuntamente con anticuerpos de ratón-anti-CK-18 / antirratón-Cy5 más CD45-PE y M con anticuerpos de ratón antialbúmina /antirratón-Cy3. J-K, L y M son ampliificaciones 20X, 60X y 10X respectivamente; los paneles N-P muestran una fotomicrografía de una sección de intestino de un ratón de control y un animal de estudio (O-P), teñido con anticuerpos anti- β -gal-FITC más anticuerpos de ratón-anti-pan-CK / antirratón-Cy5 (N-P). N y P se tiñen conjuntamente con anticuerpos CD45-PE. Células epiteliales β -gal⁺Pan-CK⁻CD45⁻ cubren un 50% (flecha sólida, panel P) de la circunferencia de las vellosidades. Las células Pan-CK⁻ / β -gal⁺ en el núcleo de las vellosidades (flecha abierta, panel O) teñida conjuntamente para CD45 (P); los paneles Q-R muestran una fotomicrografía de un corte de pulmón de un ratón de control (Q) y un animal de estudio (R) teñido con anticuerpos anti- β -gal-FITC más ratón-anti-pan-CK / antirratón-Cy5 más CD45-PE. Se observan varias células β -gal⁺ pan-CK⁺ del donante recubriendo los alveolos del animal receptor (R). Se observan las células CD45⁺ / pan-CK⁻ de origen hematopoyético claramente diferenciadas de las células epiteliales; y los paneles S-T muestran una fotomicrografía de un corte de un vaso sanguíneo de un ratón de control (S) y un linfoma tímico que se desarrolló en animal de estudio 16 semanas después del trasplante (T) teñido con anti- β -gal-FITC, anti-vWF-PE y TO-PRO3. Las células β -gal⁺ del donante se diferenciaron en células endoteliales vWF⁺ en el linfoma tímico el cual es originario del receptor, ya que las células tumorales no se tiñeron con anticuerpos anti- β -Gal.

La Fig. 5 muestra la evaluación inmunohistoquímica de células endoteliales derivadas de CMAM utilizando la microscopía de fluorescencia confocal. (a) CMAM cultivadas durante 14 días con FCEV. Se observa la tinción de la membrana típica para el receptor de adhesión, α v β 5, y para las proteínas de las uniones adherentes, ZO-1, catenina β y γ . Barra de escala = 50 μ m. (b) Morfología en campo claro de CMAM el día 0 (panel superior) y día 21 (panel inferior) tras el tratamiento con FCEV. Barra = 25 μ m.

La Fig. 6 muestra una fotomicrografía de células endoteliales derivadas de CMAM. El panel A muestra la liberación de vWF mediada por histamina a partir de endotelio derivado de CMAM. La tinción con anticuerpos contra miosina muestra cambios citoesqueléticos que consisten en un mayor número de fibras de estrés de miosina y un ensanchamiento de las uniones de abertura (flechas) (ejemplo representativo de 3 experimentos). Barra de escala = 60 μ m; el panel B muestra que el endotelio derivado de CMAM capta a-LDL. Tras 7 días, las células expresaron Tie-1, pero de nuevo no captaron a-LDL. Sin embargo, la expresión de vWVF en el día 9 se asoció con la captación de aLDL (ejemplo representativo de 10 experimentos). Barra de escala = 100 μ m; y el panel C muestra la formación del tubo vascular por parte de endotelio derivado de CMAM. Tras 6 h, se pudieron apreciar los tubos vasculares típicos (ejemplo representativo de 6 experimentos). Barra de escala = 200 μ m.

La Fig. 7 muestra una ilustración gráfica del análisis FACS de células endoteliales derivadas de CMAM. Las gráficas muestran el perfil de tinción de IgG de control isotópico (línea delgada) vs. el perfil de tinción de un anticuerpo específico (línea gruesa) (ejemplo representativo de > 3 experimentos). El número sobre las gráficas es la intensidad fluorescente media (IFM) para la tinción de IgG de control y la tinción específica del anticuerpo. El panel A muestra que la hipoxia incrementa de manera regulada la expresión de Flk1 y Tek en las células endoteliales derivadas de CMAM analizadas por citometría de flujo; el panel B muestra que la hipoxia incrementa de manera regulada la producción de FCEV por parte de las células endoteliales derivadas de CMAM. Se midieron por ELISA los niveles de FCEV y se muestran los resultados como la media \pm EEM de 6 experimentos; y el panel C muestra que la IL-1 α induce la expresión de los antígenos de HLA de clase II e incrementa la expresión de los receptores de adhesión. Las gráficas muestran el perfil de tinción de IgG de control isotópico (línea delgada) vs. el perfil de tinción de un anticuerpo específico (línea gruesa) (ejemplo representativo de 3 experimentos). El número sobre las gráficas muestra la IFM para la tinción de IgG de control y para la tinción de un anticuerpo específico.

La Fig. 8 muestra una fotomicrografía de células endoteliales derivadas de CMAM humanas. Los paneles C-F muestran las figuras reconstruidas 3D tanto para el anticuerpo anti-microglobulina- β ₂ humana-FITC (panel C) como para el anti-CD31 de ratón-FITC (panel D) y la unión de ambas (panel E), anti-vWF-Cy3 (panel F) y la unión de los tres patrones de tinción (panel G). Los paneles A y B muestran la imagen confocal de un único corte teñido con el anticuerpo anti-microglobulina- β ₂ humana-FITC y anti-vWF-Cy3 o anti-CD31 de ratón-Cy5 y anti-vWF-Cy3. Barra de escala = 100 μ m. El panel H muestra la curación de una herida que da como resultado un área muy vascularizada en la oreja perforada teñida con antimicroglobulina- β ₂-FITC y anti-vWF en ratones inyectados con células endoteliales derivadas de CMAM humanas (panel superior) o fibroblastos de prepucio humano (panel inferior). Barra de escala = 20 μ m. C = cartilago. D = dermis. El panel I muestra que la angiogénesis tumoral se deriva de las células endoteliales generadas in vivo a partir de CMAM y que resulta en un área muy vascularizada en el tumor teñido con anti-X32-microglobulina-FITC, anti-vWF y TOPRO-3. Barra de escala = 20 μ m.

La Fig. 9 muestra el comportamiento en espigas y las corrientes de sodio dependientes de voltaje expresadas en células similares a las neuronas derivadas de CMMh. El panel A muestra una fotomicrografía de neuronas derivadas

de CMMh cultivadas que muestran un comportamiento en espigas y expresan corrientes de sodio dependientes de voltaje (la sombra de la pipeta apunta hacia la célula). El panel B muestra ilustraciones gráficas de registros del pinzamiento de corriente de una neurona derivada de una CMMh. El panel C muestra ilustraciones gráficas de trazas de corriente a las que se les han sustraído las fugas de la misma neurona derivada de CMMh.

La Fig. 10 muestra análisis por inmunoelectrotransferencia y RT-PCR cuantitativa que confirman el fenotipo de tipo hepatocítico. Los paneles A y B muestran CMAMr (A) y CMAMh (B) cultivadas en Matrigel™ con FCF4 y FCH o FCF4 solo durante 21 y 28 días respectivamente. Para α FP, Cyp2b9 y Cyp2b13, los números bajo las membranas son relativos al ARNm del hígado, ya que no se detectaron transcritos en CMAM indiferenciadas. Li = ARNm hepático de humanos o de ratón; NT = sin plantilla. Ejemplo representativo de 5 estudios en ratones y 1 estudio en humanos, el panel C muestra CMAMh (B) cultivadas en Matrigel™ con FCF4 y FCH o FCF4 solo durante 21 días. FH = CMAMh inducidas por FCH y FCF4 en Matrigel™, Huh = línea celular Huh7 utilizada como control.

La Fig. 11 muestra una fotomicrografía de células de tipo hepatocítico. Las CMAM inducidas por FCF4 producen glucógeno. Se aprecia el almacenamiento de glucógeno como una acumulación de manchas oscuras (ejemplo representativo de 3 estudios). Barra de escala = 25 μ m.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Tal como se emplean en la presente, los siguientes términos y expresiones tienen los siguientes significados:

El término “expansión” se refiere a la propagación de una célula sin diferenciación.

La expresión “células intermediarias” se refiere a células producidas durante la diferenciación de una CMAM que poseen algunas pero no todas las características de una CMAM o su progenie totalmente diferenciada. Las células intermediarias pueden ser células progenitoras que están comprometidas con una ruta específica, pero no con un tipo celular específico.

El término “normal” se refiere a un animal que no sufre una malformación, mutación o enfermedad, es decir, animales sanos.

El término “autorrenovación” se refiere a la capacidad de las células para propagarse sin la adición de una estimulación externa. La presencia de citocinas u otros factores de crecimiento producidos localmente en el órgano o tejido no constituye una estimulación externa.

El término “dirigirse” se refiere a la capacidad de ciertas CMAM o su progenie para migrar de manera específica a sitios donde se puedan necesitar células adicionales.

La expresión “inhibir la expresión” se refiere a la eliminación de la función de un gen particular.

Tal como se emplea en la presente, la expresión “composición genómica o proteómica” se refiere a los componentes proteicos o génicos de una célula dada.

Los “niveles elevados de actividad telomerasa” se pueden correlacionar con la duplicación del nivel observada en la línea celular humana inmortal MCF7. Soule et al. (1973) J. Cancer Inst. 51:1409-1416.

Aplicación de esta tecnología

La tecnología de las CMAM se podría emplear para reemplazar células inertes, disfuncionales, enfermas o dañadas en el cuerpo de un mamífero. Además, estas células se podrían inyectar en el receptor utilizando células alogénicas o autólogas con o sin soportes artificiales o naturales, matrices o polímeros para corregir la pérdida de células, función anormal de células u órganos, p. ej., genética tales como mutaciones de genes que afectan a una función proteica tal como la anemia drepanocítica, hemofilia o “tesaurismosis” donde los productos se acumulan en el cuerpo debido a un procesamiento defectuoso, p. ej., enfermedad de Gaucher, enfermedad de Niemann-Pick, mucopolisacaridosis, etc. Algunos ejemplos de la restitución de células inertes o moribundas podrían ser el uso de CMAM o su progenie diferenciada en el tratamiento de la degeneración macular y otras enfermedades neurodegenerativas.

Dada la capacidad de hacer que estas CMAM “se dirijan” y se incorporen a los órganos/tejidos de un animal receptor, proliferen y se diferencien, podrían emplearse potencialmente para proporcionar nuevas células endoteliales a un corazón isquémico y también las propias células de miocardio. Existen muchos otros ejemplos diferentes.

Puede haber circunstancias médicas donde los beneficios transitorios en la función de órganos o tejidos podrían tener los efectos deseables. Por ejemplo, existen casos en la actualidad de pacientes con insuficiencia hepática conectados a un hígado bioartificial, lo cual ha sido suficiente para permitir la recuperación de la función hepática normal, obviando la necesidad de un trasplante hepático. Esta constituye una seria necesidad médica no cubierta, por ejemplo en una enfermedad hepática específica – la hepatitis C. En la actualidad existen 4-5 millones de americanos infectados con hepatitis C y se estima que un 50% de esta población contraerá cirrosis y necesitará un trasplante hepático. Este constituye un enorme problema de salud pública para el cual se necesita urgentemente un remedio. Los hepatocitos, derivados de CMAM autólogas o alogénicas, se pueden trasplantar en esta o en otras enfermedades hepáticas. Tales trasplantes pueden o bien proporcionar la función hepática de manera transitoria para permitir la recuperación de las células hepáticas del propio receptor o bien repoblar de manera permanente un hígado dañado para permitir la recuperación de la función hepática normal a través de las células del donante.

Además de muchas terapias celulares donde se administran las CMAM indiferenciadas a un humano o a otro mamífero para que se diferencien a continuación en células específicas en el donante, la progenie de las CMAM se podría diferenciar ex vivo y a continuación administrarse como células purificadas o incluso como mezclas de células para proporcionar un beneficio terapéutico. Estas CMAM en estado indiferenciado también se podrían utilizar como portadores o vehículos para suministrar fármacos o moléculas terapéuticamente beneficiosas. Esto podría emplearse para tratar cualquiera de las diferentes enfermedades que incluyen, pero sin carácter limitante, cáncer, enfermedad cardiovascular, inflamatoria, inmunitaria, infecciones, etc. De modo que, por ejemplo, se podría administrar a un paciente una célula, tal vez una célula endotelial que expresa una molécula nueva o niveles altos de una molécula angiogénica, la cual se incorporaría en los vasos sanguíneos existentes para promover la angiogénesis, por ejemplo, en el corazón; del mismo modo se podrían tener células endoteliales que producen moléculas que podrían suprimir la angiogénesis que se podrían incorporar en las células sanguíneas e inhibir su formación posterior, por ejemplo, en la retinopatía diabética o en el cáncer donde la formación de nuevos vasos sanguíneos es clave en la patogénesis, propagación y extensión de la enfermedad.

La capacidad de poblar la MO y de generar sangre ex vivo posee un uso incalculable en importantes aplicaciones médicas. Por ejemplo, en lo que respecta a la producción ex vivo de sangre, la transfusión de sangre y productos sanguíneos en todo el mundo todavía se lleva a cabo con una seguridad variable debido a la transmisión de agentes infecciosos. Las transfusiones de sangre han provocado VIH, hepatitis C y B y en la actualidad la amenaza inminente de las vacas locas o la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, ECJ. La capacidad de generar sangre in vitro, especialmente eritrocitos, podría proporcionar una alternativa segura y fiable a la extracción de sangre de personas. Puede que nunca reemplace totalmente la extracción de sangre de donantes. Las CMAMh o su progenie hematopoyética se podrían introducir en el útero de animales tal como las ovejas las cuales podrían formar células hematopoyéticas humanas y servir como fuente componentes sanguíneos humanos o proteínas de utilidad terapéutica. Lo mismo podría aplicarse a hepatocitos, islotes o muchos otros tipos celulares pero proporcionaría una alternativa a la producción de células humanas in vitro y el uso de animales como fábricas de células. También podría ser de utilidad en la escasez de sangre que se predice que tendrá lugar. Las CMAMh también podrían posiblemente trasplantarse en un embrión humano para corregir uno cualquiera de una serie de defectos.

Debido a que las CMAM pueden dar lugar a poblaciones clonales de células diferenciadas de manera específica, suponen una plataforma rica para el descubrimiento de fármacos. Esto podría implicar llevar a cabo la expresión génica, analizar la expresión génica, descubrir nuevas pautas de activación activadas por genes, proteómica y pautas de expresión proteica y modificación que las rodean. Esto podría analizarse mediante herramientas bioinformáticas, utilizando bases de datos y algoritmos para el análisis de estos datos en comparación con las bases de datos de dominio público o privadas. La información de cómo podrían actuar agentes o fármacos conocidos podría compararse con la información derivada de las CMAM, su progenie diferenciada y de un población de personas que podría estar disponible. Se podrían identificar rutas, dianas y receptores. Se podría descubrir que nuevos fármacos, anticuerpos u otros compuestos pueden producir respuestas biológicamente deseables. De manera análoga, las CMAM y su progenie diferenciada se podrían emplear como dispositivos de control de respuestas indeseadas, junto con las bases de datos, herramientas bioinformáticas y algoritmos.

Estas CMAM derivadas de un humano, ratón, rata u otro mamífero parecen ser la única célula somática (célula no germinal), no maligna, normal que se conoce hasta la fecha que expresa niveles muy altos de telomerasa incluso en células en pases avanzados. Los telómeros están extendidos en las CMAM y son cariotípicamente normales. Debido a que las CMAM inyectadas en un mamífero se dirigen a varios órganos, existe la posibilidad de que las CMAM recién llegadas a un órgano particular puedan ser autorrenovables. Como tal, poseen el potencial de repoblar un órgano no solamente por sí mismas sino también con tipos celulares diferenciados autorrenovables que podrían haber sido dañados, haber muerto o que podrían tener una función anormal debido a una enfermedad adquirida o genética.

Por ejemplo en la diabetes de tipo I tiene lugar una pérdida progresiva de células beta productoras de insulina en los islotes pancreáticos. En varias enfermedades renales tiene lugar una pérdida progresiva de la función y en algunos casos la obstrucción del glomérulo. En el caso de la diabetes, las CMAM o la progenie diferenciada podrían dirigirse hacia el páncreas y ellas mismas o mediante la interacción con las células endógenas en el páncreas, inducir la formación de islotes. Esto podría tener un impacto reparador en la diabetes. En última instancia, se podrían

descubrir condiciones, agentes o fármacos para controlar in vivo, es decir, promover o inhibir la capacidad de autorrenovación de las CMAM y controlar, o potenciar o inhibir el movimiento de una progenie diferenciada, p.ej., precursores de islotes, precursores de hepatocitos, precursores sanguíneos, precursores cardíacos y/o neurales utilizando CMAM se encontrarán probablemente rutas, métodos de activación y control que podrían inducir a las células precursoras endógenas a proliferar y diferenciarse en un órgano.

Esta misma capacidad para repoblar un tejido celular o un compartimento de un órgano y autorrenovarse y también diferenciarse podría tener numerosos usos y poseer una utilidad sin precedentes para ofrecer soluciones a las necesidades médicas no cubiertas. De modo que, por ejemplo, ciertas enfermedades genéticas donde existen deficiencias enzimáticas se han tratado mediante un trasplante de MO. A menudo esto puede ayudar pero no cura las complicaciones de la enfermedad donde pueden persistir los efectos residuales de la enfermedad en el cerebro, los huesos o en otro sitio. Las CMAM y las CMAM modificadas por ingeniería genética ofrecen la esperanza de mejorar numerosas enfermedades genéticas y adquiridas. También son útiles con fines investigadores y diagnósticos y en el descubrimiento de fármacos.

La presente invención también proporciona métodos para el descubrimiento de fármacos, genómica, proteómica y rutas de identificación; comprende analizar la composición genómica o proteómica de una CMAM, junto con el análisis de estas mediante herramientas bioinformáticas, análisis informáticos mediante algoritmos, para ensamblar y comparar bases de datos conocidas y nuevas, y comparar y contraer estas. Esto identificará componentes claves, rutas, nuevos genes y/o nuevas pautas de expresión proteica y génica, y modificación proteica (proteómica) que podría llevar a la definición de dianas para nuevos compuestos, anticuerpos, proteínas, compuestos orgánicos de peso molecular bajo u otras moléculas biológicamente activas que podrían suponer un beneficio terapéutico.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar pero no limitan la invención.

Ejemplo 1. Selección, cultivo y caracterización de células madre adultas multipotentes de ratón (CMAMR)

Aislamiento celular y expansión

Todos los tejidos se obtuvieron de acuerdo con las directrices del IACUC de la Universidad de Minnesota. Se obtuvieron células mononucleares de MO (CMNMO) mediante la separación ficoll-hypaque de MO obtenida de ratones C57/BL6 o ratones ROSA26 de 5-6 semanas. De manera alternativa, se obtuvo tejido cerebral y muscular de 129 ratones de 3 días de edad. Se extirparon músculos de las partes proximales de las patas delanteras y traseras, y se trocearon completamente. Se trató el tejido con colagenasa al 0,2% (Sigma Chemical Co, San Luis, MO) durante 1 hora a 37 °C, seguido de tripsina al 0,1% (Invitrogen, Grand Island, NY) durante 45 minutos. A continuación se trituraron las células vigorosamente y se pasaron a través de un filtro de 70 µm. Se recogieron las suspensiones celulares y se centrifugaron durante 10 minutos a 1600 rpm. Se diseccionaron los tejidos cerebrales y se trocearon completamente. Se disociaron las células por incubación con tripsina al 0,1% y ADNasa al 0,1% (Sigma) durante 30 minutos a 37 °C. A continuación se trituraron vigorosamente las células y se pasaron a través de un filtro de 70 µm. Se recogió la suspensión celular y se centrifugó durante 10 minutos a 1600 rpm.

Se colocaron en placas suspensiones de cerebro, músculo o CMNMO con una concentración de $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ en medio de expansión [FCS al 2% en medio esencial mínimo de Dulbecco bajo en glucosa (LG-DMEM, por sus siglas en inglés), 10 ng/mL de cada uno de los siguientes factores: factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP), factor de crecimiento epidérmico (FCE) y factor inhibidor de la leucemia (FIL)] y se mantuvieron a $5 \times 10^3/\text{cm}^2$. Tras 3-4 semanas, se eliminaron con microesferas magnéticas las células CD45⁺/glucoforina (Gly)-A⁺ de las células recuperadas por tripsina/EDTA. Las células CD45⁺/Gly-A⁻ se colocaron de nuevo en placas con una concentración de 10 células/pocillo en placas de 96 pocillos recubiertas con FN y se expandieron en una densidad celular comprendida entre 0,5 y $1,5 \times 10^3/\text{cm}^2$. El potencial de expansión de las CMAM fue similar independientemente del tejido a partir del cual se derivaron (Fig. 1).

Caracterización de las CMAM

Fenotípicamente, las CMAMr derivadas de MO, músculo y cerebro, y cultivadas en FN fueron CD13⁺, CD44⁻, CD45⁻, (antígeno de histocompatibilidad de clase I y clase II), Fkl^{balo} y cKit⁻, idénticas a las características de las CMAMh, tal como se describen en la solicitud internacional N.º PCT/US00/21387. Aunque la expansión celular durante los 2-3 meses iniciales fue mayor cuando las células se cultivaron en colágeno de tipo IV, laminina o Matrigel™, las células poseyeron características fenotípicas de CMM, es decir, expresaron CD44 y no expresaron CD13. Al igual que con las células humanas, las CMAMr cultivadas en FN expresaron los transcritos de oct-4 y el R-FIL.

Aproximadamente un 1% de los pocillos en los que se colocaron células 10 CD45⁺/Gly-A⁻ dieron cultivos de crecimiento continuo. Esto sugiere que las células capaces de iniciar cultivos de CMAM son raras y probablemente suponen menos de un 1/1000 de las células CD45⁺/Gly-A⁻. Las CMAMr cultivadas en FN presentaron un diámetro de 8-10 µm con un núcleo grande y un citoplasma escaso. Varias poblaciones se han cultivado durante > 100 DP

(número de veces que se duplicó la población celular). La morfología y fenotipo de las células permaneció invariante durante todo el cultivo.

Se recolectaron las CMAMr que habían experimentado 40 y 102 DP y se evaluó la longitud de los telómeros. La longitud del telómero se midió utilizando el kit de ensayo para la longitud del telómero de Pharmingen (Nueva Jersey, EE. UU.) de acuerdo con las recomendaciones del productor. La longitud media del telómero (LMT) de las CMAMr cultivadas durante 40 DP fue de 27 Kb. Cuando se evaluaron de nuevo tras 102 DP, la LMT permaneció invariante. Para el cariotipado de las CMAMr, se subcultivaron las células con una dilución 1:2, 12 h antes de la recolección, se aislaron con tripsina-EDTA y se sometieron a una incubación de 1,5 h con colcemida seguido de lisis con KCl hipotónico y fijación en ácido/alcohol tal como se describió previamente (Verfaillie et al., 1992). El análisis citogenético se llevo a cabo mensualmente y mostró un cariotipo normal, excepto para una única población que se convirtió en hiperdiploide tras 45 DP, la cual no se usó posteriormente para los estudios.

Las CMAM murinas obtenidas después de 46 y hasta >80 DP se ensayaron mediante (Q)-RT-PCR (Q = cuantitativa) para determinar los niveles de expresión de Oct4 y Rex1, dos factores de transcripción importantes en el mantenimiento del estado indiferenciado de las células ME. Se extrajo ARN de CMAM de ratón, progenie diferenciada neuroectodérmica (día 1-7 tras la adición de FCFb) y células ME de ratón. Se transcribió de manera inversa el ARN y el ADNc resultante se sometió a 40 ciclos de amplificación (ABI PRISM 7700, Perkin Elmer/Applied Biosystems) en las siguientes condiciones de reacción: 40 ciclos de una PCR de dos etapas (95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 60 segundos) tras la desnaturalización inicial (95 °C durante 10 minutos) con 2 µL de solución de ADN, tampón de reacción para PCR TaqMan SYBR Green Universal Mix 1X. Los cebadores se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1: Cebadores utilizados

NEO	5'-TGGATTGCACGCAGGTTCT-3'
	5'-TTCGCTTGGTGGTCAATG-3'
Oct4	5'-GAAGCGTTTCTCCCTGGATT-3'
	5'-GTGTAGGATTGGGTGCGTT-3'
Rcx 1	5'-GAAGCGTTTCTCCCTGGAATTC-3'
	5'-GTGTAGGATTGGGTGCGTTT-3'
otx 1	5'-GCTGTTGCAAAGACTCGCTAC-3'
	5'-ATGGCTCTGGCACTGATACGGATG-3'
otx2	5'-CCATGACCTATACTCAGGCTTCAGG-3'
	5'-GAAGCTCCATATCCCTGGGTGAAAAG-3'
Nestin 5'	5'-GGAGTGTGCGCTTAGAGGTGC-3'
	5'-TCCAGAAAGCCAAGAGAAGC-3'

Se normalizaron los niveles de ARNm utilizando GADPH como gen constitutivo y se compararon con los niveles en las células ME de ratón. Los ARNm de Oct4 y Rex 1 estuvieron presentes en niveles similares en CMAM derivadas de MO, músculo y cerebro. Los niveles de ARNm de Rex1 fueron similares en CMAMr y células MEr, mientras que los niveles de ARNm de Oct4 fueron aproximadamente 1000 veces menores en las CMAM que en las células ME.

El perfil génico expresado de CMAM derivadas de MO, músculo y cerebro de ratón es muy similar

Para evaluar de manera adicional si las CMAM derivadas de diferentes tejidos eran similares, se examinó el perfil génico expresado por CMAM derivadas de MO, músculo y cerebro utilizando la micromatriz génica U74A de Affimetrix. Resumiendo, se extrajo ARNm de $2-3 \times 10^6$ CMAM derivadas de MO, músculo o cerebro, cultivadas durante 45 duplicaciones de la población. La preparación del ADNc, la hibridación con la micromatriz U74A que contenía 6000 genes murinos y 6000 grupos de EST (secuencias de identificación expresadas, siglas en inglés) y la adquisición de los datos se llevaron a cabo de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (todos de Affimetrix, Santa Clara, CA). El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando el software GeneChip® (Affimetrix). Se consideró significativo un aumento o descenso en una proporción de 2,2 (Iyer V.R. et al., 1999; Scherf U. et al. 2000; Alizadeh A.A. et al., 2000). Se determinó el valor r2 utilizando un análisis de regresión lineal (Fig. 2).

La comparación entre el perfil génico expresado por CMAM de los tres tejidos mostró que <1% de los genes fueron expresados en niveles que diferían en una proporción > 2,2 en las CMAM de MO respecto a las CMAM de músculo. De manera análoga, únicamente <1% de los genes fueron expresados en un nivel que difería en una proporción >2,2 en las CMAM derivadas de MO respecto a las de cerebro. Ya que el coeficiente de correlación entre las

diferentes poblaciones de CMAM fue >0.975 , se concluyó que las CMAM derivadas de los diferentes tejidos son extremadamente homólogas, en línea con el fenotipo descrito anteriormente y las características de diferenciación descritas en el Ejemplo 5.

- 5 Empleando las condiciones de cultivo específicas para ratón, se mantuvieron los cultivos de CMAMr durante más de 100 duplicaciones de la población. Los cultivos de CMAMr se iniciaron con médula de ratones C57B1/6, ratones ROSA26 y ratones CS7BL/6 transgénicos para -HMG-LacZ.

10 **Ejemplo 2. Selección y cultivo de células madre adultas multipotentes de rata (CMAMrata)**

Se obtuvieron CMN y de MO a partir de ratas Sprague Dawley o Wistar y se colocaron en placas en condiciones similares a las de las CMAMr. Tras 21-28 días, se eliminaron las células CD45⁺ de las células y se subcultivaron las células CD45⁻ resultantes con una concentración de 10 células/pocillo.

- 15 Las CMAM de rata se expandieron en cultivo de manera similar a las CMAMr durante >100 DP. Las condiciones de expansión del cultivo de CMAM de rata requirió la adición de FCE, FCDP-BB y FIL y ser cultivadas en FN, pero no en colágeno de tipo 1, laminina o Matrigel™. Las CMAMrata fueron CD44, CD45 y clase I y clase II de MHC negativas, y expresaron niveles elevados de telomerasa. La capacidad de una célula normal para crecer durante más de 100 duplicaciones celulares no tiene precedentes, es algo inesperado y va contra los dogmas
- 20 convencionales de más de dos décadas.

Se recolectaron las CMAMrata que habían experimentado 42 DP, 72 DP, 80 DP y 100 DP y se evaluó la longitud de los telómeros. Los telómeros no se acortaron en el cultivo, como se determinó mediante análisis por transferencia de Southern tras 42 DP, 72 DP, 80 DP y 100 DP. Análisis mensuales citogenéticos de CMAMrata revelaron un cariotipo

25 normal.

30 **Ejemplo 3. Selección y cultivo de células madre adultas multipotentes humanas (CMAMh)**

Se obtuvo MO de donantes voluntarios sanos (edad entre 2 y 50 años) tras el consentimiento informado utilizando las directrices del comité de la Universidad de Minesota sobre el uso del sujeto humano en investigación. Se obtuvieron CMNMO mediante la centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Paque y se eliminaron las células de glucoforina-A⁺ y CD45⁺ utilizando esferas micromagnéticas (Miltenyii Biotec, Sunnyvale, CA).

- 35 Las condiciones de expansión fueron las siguientes: se diluyeron 5×10^3 células CD45⁻/GlyA⁻ en 200 μ L de medio de expansión [58% de DMEM-LG, 40% de MCDB-201 (Sigma Chemical Co, San Luis, MO), suplementado con 1X de insulina-transferrina-selenio (ITS), IX albúmina de suero bovino - ácido linoleico (LA-BSA, por sus siglas en inglés), dexametasona 10^{-8} M, 2-fosfato del ácido ascórbico 10^{-4} M (todos de Sigma), 100 U de penicilina y 1000 U de estreptomycin (Gibco)] y 0-10% de suero bovino fetal (FCS, por sus siglas en inglés) (Hyclone Laboratories, Logan, UT) con 10 ng/mL de FCE (Sigma) y 10 ng/mL de FCDP-BB (R&D Systems, Mineápolis, MN)] y se colocaron en
- 40 placas de 96 pocillos que se habían recubierto con 5 ng/mL de FN (Sigma). Se renovó el medio cada 4-6 días. Una vez que los pocillos fueron confluentes en >40 -50%, se separaron las células adherentes con 0.25% de tripsina - EDTA (Sigma) y se volvieron a colocar en placas con una dilución 1:4 en medio de expansión de CMAM y en recipientes de cultivo mayores recubiertos con 5 ng/mL de FN para mantener densidades celulares entre 2 y 8×10^3 células/cm².

45 Las CMAM indiferenciadas no expresaron CD31, CD34, CD36, CD44, CD45, CD62-E, CD62-L, CD62-P, HLA de clase I y clase II, cKit, Tie, TEK, $\alpha_v\beta_3$, VE-cadherina, molécula de adhesión celular vascular (MACV) ni molécula de adhesión intracelular (MAIC)-1. Las CMAM expresaron niveles bajos/muy bajos de microglobulina β_2 , $\alpha_v\beta_5$, CDw90, AC133, Fik1 y Fit1 y niveles elevados de CD13 y CD49b (Fig. 3).

50

50 **Ejemplo 4. Análisis inmunofenotípico**

Inmunofluorescencia

- 55 1. Se fijaron células cultivadas con metanol y paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente y se incubaron de manera secuencial durante 30 minutos con cada anticuerpo primario y con o sin anticuerpo secundario. Entre los pasos, se lavaron las preparaciones con PBS/BSA. Se examinaron las células por microscopía de fluorescencia (Zeiss Axiovert; Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY) y microscopía de fluorescencia confocal (microscopio confocal 1024, Olympus AX70, Olympus Optical Co. LTD, Japón). Para determinar la
- 60 frecuencia de los diferentes tipos celulares en un cultivo dado, se contó el número de células con tinción positiva para un anticuerpo dado en cuatro campos visuales (50-200 células por campo).
- 65 2. Tejidos recolectados: Se fijaron con acetona (Fisher Chemicals) muestras de MO y sanguíneas centrifugadas durante 10 minutos a temperatura ambiente con una citospin. En el caso de órganos sólidos, se colocaron sobre portaobjetos de vidrio cortes de tejidos congelados en fresco de 5 μ m de grosor y se fijaron inmediatamente con acetona durante 10 a temperatura ambiente. Después de la incubación con

sueros de isotipo durante 20 minutos, se tiñeron en serie cortes de tejidos o preparaciones obtenidas por centrifugación con una citospin para detectar antígenos específicos del tejido, β -gal y una tinción de contraste del núcleo (DAPI o TO-PRO-3). Los cubreobjetos se prepararon utilizando el kit Slowfade-antifade (Molecular Probes Inc., Eugene, OR. EE. UU.). Los portaobjetos se examinaron por microscopía de fluorescencia y microscopía de fluorescencia confocal

3. Anticuerpos: Se fijaron las células con paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente o metanol a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se incubaron de manera secuencial durante 30 minutos cada vez con un Ab primario y un Ab anti-IgG de conejo o de ratón conjugado con FITC o Cy3. Entre cada paso, las preparaciones se lavaron con PBS+1% de BSA. Los anticuerpos anti-Ter119, anti-CD3, anti-CD19, anti-Gr1, anti-Mac1, anti-CD62E, anti-CD31 y anti-CD45 conjugados con FITC o PE se obtuvieron de BD Pharmingen. Los Abs (abreviatura de antibodies, anticuerpos en inglés) contra GFAP (clon G-A-5, 1:400), galactocerebrósido (GalC) (policlonal, 1:50), MBP (policlonal, 1:50), GABA (clon GB-69, 1:100), parvalbúmina (clon PARV-19, 1:2000), TuJ1 (clon SDL.3D10, 1:400), NF-68 (clon NR4, 1:400), NF-160 (clon NN 18, 1:40) y NF-200 (clon N52, 1:400), NSE (policlonal, 1:50), MAP2-AB (clon AP20, 1:400), Tau (policlonal, 1:400), TH (clon TH-2, 1:1000), DDC (clon DDC-109, 1:100), TrH (clon WH-3, 1:1000), serotonina (policlonal, 1:2000), glutamato (clon GLU-4, 1:400) y miosina de contracción rápida (clon MY-32, dilución 1:400) provinieron de Sigma. DAPI y TOPRO-3 provinieron de Molecular Probes. Los Abs contra vWF (policlonal; 1:50), Neuro-D (policlonal, 1:50), c-ret (policlonal, 1:50) y Nurrl (policlonal; 1:50) provinieron de Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA. Los Abs contra PSA-NCAM (policlonal, 1:500) de Phanmingen, San Diego, CA y contra el transportador de serotonina (clon MAB 1564, 1:400), DTP (policlonal, 1:200), canal de voltaje dependiente de Na (policlonal, 1:100), receptores de glutamato 5, 6 y 7 (clon 3711:500) y receptor NMDA (policlonal 1:400) de Chemicon International, Temecula, CA. Los Abs anti-nestina (1:400) constituyeron un amable obsequio del Dr. U. Lendahl, Universidad de Lund, Suecia. Los anticuerpos contra NSE (1:50) pan-citoqueratina (número de catálogo C-2562; 1:100), CK-18 (C-8541; 1:300), albúmina (A-6684; 1:100) provinieron todos de Sigma. Los anticuerpos policlonales contra Fik1, Flt1, Tek, HNF-1 β se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA. Los anticuerpos anti-nestina (1:400) constituyeron un amable obsequio del Dr. U. Lendahl, Universidad de Lund, Suecia. Las IgGs de ratón, rata o conejo de control y los anticuerpos secundarios marcados con FITC/PE/Cy3 y Cy5 se obtuvieron de Sigma. El anticuerpo de conejo anti- β -gal-FITC se obtuvo de Rockland Immunochemicals, EE. UU. TO-PRO-3 se obtuvo de Molecular Probes Inc. y DAPI se obtuvo de Sigma.
- B. Tinción con X-GAL: Se tiñeron cortes de tejido mediante la actividad de la enzima β -galactosidasa utilizando el kit de tinción β -gal de Invitrogen, pH 7,4. Se siguieron las instrucciones del fabricante excepto en el paso de la fijación, durante el cual se incubaron los cortes de tejido durante 5 min en lugar de 10 min.
- C. FACS: Para la FACS, se separaron CMAM indiferenciadas y se tiñeron de manera secuencial con anti-CD44, CD45, CD13, cKit, MHC de clase I y clase II o microglobulina- β_2 (BD Pharmingen) y anticuerpos secundarios conjugados con FITC o PE, se fijaron con paraformaldehído al 2% hasta su análisis utilizando un FACS-Calibur (Becton-Dickinson).

40 **Ejemplo 5. Origen celular único de estirpes diferenciadas a partir de CMAM**

Se evaluó la capacidad de diferenciación de las CMAMr o CMAMrata añadiendo factores de diferenciación (citocinas) elegidos basándose en lo que se ha descrito para la diferenciación de CMAMh o células ME en mesodermo, neuroectodermo y endodermo. La diferenciación requirió que las células se volvieran a colocar en medio libre de suero con una concentración de $1-2 \times 10^4$ células/cm², sin FCE, FCDP-BB y FIL pero con citocinas específicas de la estirpe. Se determinó la diferenciación mediante inmunohistología con marcadores específicos de tejido [miosina de contracción lenta y MyoD (músculo), factor de von-Willebrand (vWF) y Tek (endotelio), NF200 y MAP2 (neuroectodérmico) y citoqueratina-18 y albúmina (endodérmico)], RT-PCR y estudios funcionales.

50 Diferenciación de CMAM en células neuroectodérmicas

Palmer et al. mostraron que los neuroprogenitores se pueden expandir en cultivo con FCDP-BB y se puede inducir su diferenciación eliminando el FCDP y añadiendo como factor de diferenciación FCFb. Basándose en estos estudios y en estudios llevados a cabo utilizando CMAMh, CMAMr y CMAMrata se colocaron en pocillos recubiertos con FN sin FCDP-BB y FCE pero con 100 ng/mL de FCFb. Se observó la maduración progresiva de células similares a las neuronas a lo largo de todo el cultivo. Tras 7 días, la mayoría de las células expresaron nestina. Tras 14 días, un 15-20% de las CMAM adquirieron características fenotípicas y morfológicas de astrocitos (GFAP⁺), un 15-20% de oligodendrocitos (galactocerebrósido (GalC)⁺) y un 50-60% de neuronas (neurofilamento-200 (NF-200)⁺). Nunca se detectaron en la misma célula NF200, GFAP o GalC, lo que sugiere que es poco probable que las células similares a las neuronas fueran CMAMh o células neurogliales que expresaban de manera inapropiada marcadores neuronales. Las células similares a las neuronas también expresaron Tau, MAP2 y NSE. Aproximadamente un 50% de las neuronas expresaron ácido gamma-aminobutírico (GABA) y parvalbúmina, un 30% tirosina-hidroxilasa y dopa-decarboxilasa (DDC) y un 20% serotonina- y triptófano-hidroxilasa. La diferenciación fue similar cuando las CMAM se expandieron durante 40 o >90 DP. La Q-RT-PCR, llevada a cabo tal como se describe en el Ejemplo 1, confirmó la expresión de marcadores neuroectodérmicos: en el día 2, las CMAM expresaron ARNm de otx1 y otx2 y tras 7 días se detectó ARNm de nestina.

A continuación se evaluó el efecto del factor de crecimiento de fibroblastos (FCF)-8b como factor de diferenciación. Este es importante para el desarrollo in vivo del mesencéfalo y se utilizó in vitro para inducir neuronas serotoninérgicas y dopaminérgicas en células ME murinas que se diferenciaron en CMAMh. Cuando se cultivaron CMAMh confluentes (n = 8) con 10 ng/mL de FCF-8b + FCE, se observó diferenciación en células con una tinción positiva de marcadores neuronales pero no así oligodendrocitos ni astrocitos. Las neuronas presentaron características de neuronas GABAérgicas (GABA⁺, 40 ± 4 %), dopaminérgicas (DOPA, TH, DCC y DTP⁺, 26 ± 5 %) y serotoninérgicas (TrH, serotonina y transportador de serotonina⁺, 34 ± 6 %). Las neuronas DOPA⁺ se tiñeron con Abs contra Nurrl, lo que sugiere diferenciación en neuronas DA mesencefálicas. Las neuronas inducidas por FCF-8b no presentaron características electrofisiológicas de neuronas maduras. Por tanto, las células cultivadas a partir de cultivos de 3 semanas mantenidos con FCF-8b junto con la línea celular de glioblastoma, U-87, y el FCF-8b durante 2-3 semanas adicionales.

Las neuronas adquirieron una morfología más madura con un tamaño celular, un número, una longitud y complejidad de las neuritas mayores y adquirieron características electrofisiológicas de neuronas maduras (un flujo hacia el interior transitorio, bloqueado de manera reversible con tetrodotoxina 1 μM (TTX), junto con la evolución temporal transitoria y la activación dependiente de voltaje del flujo hacia el interior es típico de los flujos de sodio dependientes de voltaje y se observa únicamente en las neuronas maduras).

Cuando se cultivaron CMAMh (n = 13) con 10 ng/mL de factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDC) + FCE, tuvo lugar diferenciación exclusivamente en neuronas positivas para DOPA, TH, DCC, DTP y Nurrl. Aunque el FNDC promueve la diferenciación neural de células ME y CMN (Peault, 1996; Choi et al. 1998), ningún estudio había mostrado la diferenciación exclusiva en neuronas similares a las DA.

Se observaron resultados similares para CMAMr inducidas con FCFb y CMAMrata con FCFb y FNDC. En el ejemplo 10 se presentan estudios adicionales en células neuronales derivadas de CMAM.

Diferenciación de CMAM en células endoteliales

Se indujo la diferenciación en endotelio como un ejemplo de mesodermo. Las células CMAMr o CMAMrata indiferenciadas no expresaron los marcadores endoteliales CD31, CD62E, Tek o vWF, pero expresaron niveles bajos de Fik1. Se cultivaron las CMAMr o CMAMrata en pocillos recubiertos con FN con 10 ng/mL del factor de diferenciación endotelial FCEV-B. Tras el tratamiento con FCEV durante 14 días, > 90% de las CMAM, independientemente del número de DP que habían experimentado, expresaron Flt1, CD31, vWF o CD62, lo que es coherente con la diferenciación endotelial. Al igual que las células endoteliales primarias, las células endoteliales derivadas de CMAM formaron tubos vasculares en las 6 horas posteriores a su colocación de nuevo en Matrigel™.

De manera similar, las CMAMh expresaron Fik1 y Flt1 pero no CD34, Muc18 (P1H12), PECAM, selectina P y E, CD36 o Tie/Tek. Cuando las CMAMh con una concentración de 2×10^4 células/cm² se cultivaron en medio libre de suero con 20 ng/mL del factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV), las células expresaron CD34, VE-cadherina, MACV y Muc-18 a partir del 7.º día. El 14.º día también expresaron Tie, Tek, Fik1 y Flt1, PECAM, selectina P y selectina E, CD36, vWF y conexina-40. Además, las células pudieron incorporar lipoproteínas de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés). La inmunoelectrotransferencia confirmó los resultados de la tinción histoquímica. Para inducir la formación de los tubos vasculares, CMAM cultivadas durante 14 días con FCEV se colocaron de nuevo en Matrigel™ con 10 ng/mL de FCEV-B durante 6 horas. No se apreció diferenciación endotelial cuando se utilizaron CMAMh cultivadas en >2% de FCS. Además, cuando se dejó FCS en el medio durante la diferenciación, no se generaron células endoteliales.

Cuando se subcultivaron CMAMh se obtuvo una expansión de al menos 1000 veces, lo que sugiere que los precursores endoteliales generados a partir de CMAMh mantienen un potencial proliferativo significativo. La expansión celular fue incluso mayor cuando se añadió FCS a los cultivos después del 7.º día.

Cuando se administraron CMAMh derivadas de células endoteliales por vía intravenosa (i.v.) a ratones NOD-SCI a los que se les había implantado un carcinoma de colon humano bajo la piel, se pudo observar una contribución de las células endoteliales humanas a la neovascularización en los tumores. Por tanto, puede que sea posible incorporar células endoteliales genéticamente modificadas para obtener un beneficio terapéutico, es decir, para inhibir la angiogénesis en, por ejemplo, un cáncer o para promoverla para potenciar la vascularización en miembros u otros órganos tales como el corazón. En el ejemplo 9 se presentan estudios adicionales en células endoteliales derivadas de CMAM.

Diferenciación de CMAM en endodermo

Se evaluó si las CMAMr o CMAMrata se podrían diferenciar en células endodérmicas. Se evaluaron varias condiciones de cultivo diferentes incluido el cultivo con los siguientes factores de diferenciación: factor de crecimiento de queratinocitos (FCQ), factor de crecimiento de hepatocitos (FCH) y FCF-4, ya sea en pocillos recubiertos con Matrigel™, FN, colágeno o laminina. Cuando se colocaron de nuevo en Matrigel™ con 10 ng/mL de

FCF-4 + 10 ng/mL de FCH, aproximadamente un 70% de las CMAM adquirieron características fenotípicas y morfológicas de células similares a hepatocitos. Las células se volvieron epitelioides, aproximadamente un 10% de las células se volvieron binucleares y aproximadamente un 70% de las células presentaron una tinción positiva para albúmina, citoqueratina (CK)-18 y HNF-1P.

Las células similares a las células endodérmicas generadas en cultivos que contenían FCF4 y FCH también presentaron características funcionales de hepatocitos, determinadas midiendo los niveles de urea en los sobrenadantes de CMAM indiferenciadas y células inducidas con FCF4 y FCH utilizando el Kit 640 para urea y nitrógeno de Sigma de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. No se detectó urea en los cultivos de CMAM indiferenciadas. La producción de urea se situó en 10 µg/célula/hora 14 días después de la adición de FCF4 y FCH y permaneció detectable y con niveles similares hasta el día 25.º. Esto es comparable a los hepatocitos de rata primarios cultivados en monocapa. La presencia de albúmina junto con la producción de urea apoya la idea de la diferenciación de hepatocitos a partir de CMAM in vitro. En el ejemplo 11 se presentan más estudios en hepatocitos derivados de CMAM.

Dada la probable existencia de una célula precursora de una estirpe endodérmica, las CMAM probablemente darán lugar a una célula que forma diferentes células en el hígado, en el páncreas, componentes tanto exocrinos como endocrinos y otras estirpes tisulares celulares derivadas de células endodérmicas.

Se indujo la diferenciación de CMAM derivadas de músculo o cerebro en mesodermo (células endoteliales), neuroectodermo (astrocitos y neuronas) y endodermo (células similares a los hepatocitos) utilizando los métodos descritos anteriormente para CMAM derivadas de MO.

Transducción

Para demostrar que las células diferenciadas se derivaban de una única célula y que las CMAM eran realmente células multipotentes "clonales", se prepararon cultivos en los cuales se habían transducido las CMAM con un vector retroviral y se observó que las células indiferenciadas y su progenie presentaban el retrovirus insertado en el mismo sitio en su genoma.

Se llevaron a cabo estudios utilizando dos CMAM derivadas de manera independiente de ROSA26, dos CMAM C57BL/6 y una población de CMAMrata expandidas entre 40 y >90 DP, así como con CMAM de rata "clonal" y de ratón "clonal" transducidas con eGFP. No se apreciaron diferencias entre células sin transducir y las transducidas con eGFP. Cabe señalar que la expresión de eGFP persistió en las CMAM diferenciadas.

En concreto las CMNMO de rata y murinas cultivadas en FN con FCE, FCDP-BB y FIL durante tres semanas se transdujeron en dos días consecutivos con un vector oncorretroviral de eGFP. Posteriormente, se eliminaron las células GlyA⁺ y CD45⁺ y se subcultivaron las células con una concentración de 10 células/pocillo. Las CMNMO de rata transducidas con eGFP se expandieron durante 85 DP. De manera alternativa, se emplearon CMAM de ratón expandidas durante 80 DP. Se generaron subcultivos de CMAM indiferenciadas colocando en placas 100 CMAM de cultivos mantenidos durante 75 DP y expandiéndolas de nuevo hasta >5 x 10⁶ células. Se indujo in vitro la diferenciación de las CMAM expandidas en endotelio, neuroectodermo y endodermo. Tal como se describe en el ejemplo 4, se mostró la diferenciación de la estirpe tiñendo con anticuerpos específicos para esos tipos celulares.

Origen celular único de la progenie neuroectodérmica y mesodérmica

Para probar el origen celular único de la progenie neuroectodérmica y mesodérmica diferenciada se empleo el marcaje retroviral (Jordan et al., 1990; Nolte et al., 1996). Se transdujo una fracción de las CMAMh obtenidas tras 20 DP con un retrovirus MFG-eGFP. Se diluyeron las CMAMh eGFP⁺ en CMAM no transducidas de los mismos donantes para obtener una concentración final de ~ 5% de células transducidas. Se colocaron estas mezclas en placas con una concentración de 100 células/pocillo y se expandió el cultivo hasta que se obtuvieron >2 x 10⁷ células. Se indujo la diferenciación de grupos de 5 x 10⁶ CMAM en estirpes neuroectodérmicas, de endotelio y de mioblastos esqueléticos. Tras 14 días en condiciones de diferenciación, se recolectaron las células y se utilizaron para identificar el sitio de integración retroviral y la coexpresión de eGFP y marcadores endoteliales, musculares y neuroectodérmicos.

Para la diferenciación en mioblastos, las CMAMh se colocaron en placas con una concentración de 2 x 10⁴ células/cm² en FCS al 2%, medio de expansión que contenía FCE y FCDP y se trataron con 5-azacitidina 3 µM en el mismo medio durante 24 h. Posteriormente, se mantuvieron las células en medio de expansión con FCDP-BB, FCE y FCS al 2%. Para la diferenciación endotelial, las CMAMh se colocaron de nuevo en placas con una concentración de 2 x 10⁴ células/cm² en medio de expansión exento de suero sin FCE ni FCDP pero con 10 ng/mL de FCEV-B durante 14 días.

La evaluación por inmunofluorescencia mostró que un 5-10% de las células en cultivos inducidos a diferenciarse con 5-azacitidina presentaban una tinción positiva para eGFP y actina esquelética, un 5-10% de las células inducidas a diferenciarse en endotelio se teñían tanto para eGFP como para vWF y un 5-10% de las células inducidas a

diferenciarse en neuroectodermo se teñían de manera conjunta para eGFP y NF-200 o GFAP o MBP. Para definir el sitio de inserción retroviral, se secuenció la región adyacente genómica del hospedador en CMAM y su progenie diferenciada. El número de insertos retrovirales en las distintas poblaciones estuvo comprendido entre uno y siete. Tal como se muestra en la Tabla 2, se identificó la secuencia idéntica y única adyacente al inserto retroviral en células neuroectodérmicas, de endotelio y de músculo en la población A16 de la que se obtuvo el mapa genético del cromosoma 7.

Tabla 2: Origen celular único de células neuroectodérmicas, de músculo y endotelio

	Secuencia: 3'-LTR-ccaaaatt
Clon A16 (Crom. 7)	TAG CGGCCGCTTG AATTCGAACG CGAGACTACT GTGACTCACA CT
5-Azacidina	TAG CGGCCGCTTG AATTCGAACG CGAGACTACT GTGACTCACA CT
FCEV	TAG CGGCCGCTTG AATTCGAACG CGAGACTACT GTGACTCACA CT
FCFb	TAG CGGCCGCTTG AATTCGAACG CGAGACTACT GTGACTCACA CT
Clon A12-A (Crom. 9)	ATTTATA TTCTAGTTTAT TTGTGTTTGGG GCAGACGAGG
5-Azacidina	ATTTATA TTCTAGTTTAT TTGTGTTTGGG GCAGACGAGG
FCEV	ATTTATA TTCTAGTTTAT TTGTGTTTGGG GCAGACGAGG
FCFb	ATTTATA TTCTAGTTTAT TTGTGTTTGGG GCAGACGAGG
Clon A12-A (Crom. 12)	TCCTGTCTCA TTCAAGCCAC ATCAGTTACA TCTGCATTTT
5-Azacidina	TCCTGTCTCA TTCAAGCCAC ATCAGTTACA TCTGCATTTT
FCEV	TCCTGTCTCA TTCAAGCCAC ATCAGTTACA TCTGCATTTT
FCFb	TCCTGTCTCA TTCAAGCCAC ATCAGTTACA TCTGCATTTT

En la Tabla 3 se muestran los cebadores específicos diseñados para la LTR 3' y para las secuencias genómicas adyacentes y utilizando PCR en tiempo real, se confirmó que el sitio de inserción retroviral era idéntico en células diferenciadas e indiferenciadas. Estos resultados prueban que la secuencia adyacente y que las secuencias de ADN de eGFP están presentes en cantidades similares. El clon A12 contuvo dos insertos retrovirales, localizados en los cromosomas 1 y 7 respectivamente, y se pudieron detectar ambas secuencias adyacentes no solamente en CMAMh sino también en estirpes neuroectodérmicas, de endotelio y de músculo. Para determinar si esto representaba la progenie de una única célula con dos integrantes retrovirales o la progenie de dos células se empleó PCR en tiempo real para comparar la cantidad relativa de las secuencias adyacentes a eGFP en los cromosomas 1 y 7. Se observó que estaban presentes cantidades similares de ambas regiones adyacentes en las células neuroectodérmicas, de endotelio y de músculo lo que sugiere que una única célula con dos insertos retrovirales es probablemente responsable de las CMAMh y de su progenie que son positivas para eGFP. En las otras poblaciones que contenían 3 o más insertos retrovirales no fue posible determinar si los insertos se debían a múltiples sitios de inserción en células únicas o en varias células que contribuían a la fracción positiva para eGFP. Sin embargo, el hallazgo de que en 2 poblaciones, la progenie diferenciada en músculo, endotelio y neuroectodermo se deriva de una única célula progenitora derivada de MO prueba por primera vez de manera definitiva que se pueden cultivar células primitivas a partir de MO que se diferencian en el nivel de única célula en células de estirpe mesodérmica así como las tres estirpes diferentes del neuroectodermo.

Tabla 3: Regiones adyacentes y cebadores

Clon	Secuencia genómica
Secuencia adyacente de rata	<u>GATCCTTGGGAGGGTCTCCTCAGATTGATTGACTGCCACCT</u> CGGGGGTCTTTCAAAGTAACTCCAAAAGAAGAATGGGTTGTAGTTAT TAAACGGTCTTAGTAAAGTTTGGTITTGGGAATCACAGTAAACAAT <u>CACATCACAACTCCAATCGTTCCGTGAAA</u>
Secuencia adyacente de ratón	<u>GATCCTTGGGAGGGTCTCCTCAGATTGATTGACTGCCATAAGTTA</u> TAAGCTGGCATGACTGTGTGCTAAGGACACTGGTGAAGC

Negrita: MSCV LTR; **Negrita y subrayado:** cebador de MSCV LTR utilizado para la Q-PCR **cursiva y subrayado:** Cebadores de la secuencia adyacente utilizados para la Q-PCR.

Ejemplo 6: Dirección e injerto de las CMAM de mamífero en numerosos órganos en el cuerpo

Se evaluaron CMAMr para determinar si poseían la capacidad de injertarse y diferenciarse in vivo en células específicas del tejido. Se cultivaron las CMAMr tal como se describe en el Ejemplo 1 a partir de un ratón ROSA26, C57 negro 6 transgénico para LacZ. Se inyectaron i.v. 10^6 CMAMr del ratón LacZ en la vena de la cola de ratones NOD-SCID con o sin 250 rades de radiación corporal total 4-6 horas antes de la inyección. Se sacrificaron los animales por dislocación cervical 4-24 semanas después de las inyecciones.

Recolección del tejido

Sangre y médula ósea: Se obtuvieron 0,5-1 mL de sangre en el momento en que se sacrificaron los animales. Se recogió la MO extrayéndola de fémures y tibias. Para el fenotipado, se eliminaron los eritrocitos de la sangre y médula ósea utilizando cloruro amónico enfriado con hielo (Stem Cell Technologies Inc., Vancouver, Canada) y se utilizaron 10^5 células para la centrifugación con una citospin. Para el trasplante en serie, se trasplantaron 5×10^7 células de 2 fémures y 2 tibias en receptores secundarios individuales a través de la inyección en la vena de la cola. Se sacrificaron los receptores secundarios tras 7-10 semanas.

Órganos sólidos: Se inflaron los pulmones con 1 mL de una dilución 1:4 del compuesto OCT (Sakura-Finetek Inc, EE. UU.) en PBS. Se recolectaron muestras de bazo, hígado, pulmón, intestino, músculo esquelético, miocardio, riñón y cerebro de los animales receptores y se congelaron en OCT a -80°C y en ARN Later (Ambion Inc., Austin, TX, EE. UU.) a -20°C para PCR cuantitativa.

CMAMr se injerta y diferencia en células específicas del tejido in vivo

Se evaluó el injerto de células que contenían el transgén β -gal/neomicina (NEO, por sus siglas en inglés) (Zambrowicz et al., 1997) mediante inmunohistoquímica para β -gal y mediante Q-PCR para NEO. La inmunohistoquímica y la Q-PCR se llevaron a cabo tal como se describe en los Ejemplos 5 y 1 respectivamente. Los cebadores se enumeran en la Tabla 1.

Se detectó el injerto, definido como detección de $>1\%$ de células anti- β -gal, en tejidos hematopoyéticos (sangre, MO y bazo) así como en epitelio pulmonar, hepático e intestinal de todos los animales receptores tal como se muestra en la Tabla 4 y Fig. 4.

Tabla 4: Niveles de injerto en ratones NOD-SCID trasplantados con CMAM ROSA26.

Animal	Tiempo (Semanas)	Niveles de injerto (%) determinados por inmunofluorescencia o (Q-PCR)						
		Radiación	Médula	Sangre	Bazo	Hígado	Pulmón	Intestino
1	4	No	2 (1)	2	5	7	4	2
2	5	No	3 (4)	4	5	9	5	3
3	10	No	1	3	3	6	3	2
4	16	No	4	2	3	4	3	4 (4,9)
5	24	No	3	2	3	6	4	1
6	8	Sí	8 (8)	6	4	5	2 (1,1)	7
7	8	Sí	10	8	7 (7,3)	4	6	8
8	8	Sí	5	8	3	5	5	6
9	8	Sí	7	5	5	6	4	6
10	10	Sí	5 (6)	7	9 (123)	5	2	8
11	11	Sí	8	8	6	5	3	10 (11,9)
12	11	Sí	6	5	4	8 (6,2)	10 (12,3)	8
SR-1	7	Sí	6	7	5	1 (1,7)	5	8
SR-2	10	Sí	5	4	8	3	4	6

Células β -gal⁺ en MO (Figs. 4B-F) y bazo (Figs. 4H-I) marcadas conjuntamente con Abs anti-CD45, anti-CD19, anti-Mac1, anti-Gr1 y anti-Ter119. Se observaron resultados similares en la sangre periférica. Cabe destacar que no se observaron linfocitos T β -gal⁺CD3⁺ en sangre, ni MO ni bazo aunque se observaron linfocitos T β -gal⁺CD3⁺ en ratones quiméricos. En la actualidad se desconoce la razón de esto.

El injerto en el bazo tuvo lugar principalmente en forma de agregados de células del donante, coherente con la hipótesis de que cuando las CMAM se dirigen al bazo, proliferan localmente y se diferencian para formar una colonia de células del donante, similar a la CFU-S. No se cree que la diferenciación de CMAMr en células hematopoyéticas in vivo se pueda atribuir a la contaminación de las CMAMr con CMH. En primer lugar, se eliminan las células CD45 de las CMNMO mediante selección por columna antes de iniciar los cultivos de CMAMr. En segundo lugar, los factores de transcripción hematopoyéticos o mesodérmicos tempranos, incluidos la braquiurina (Robertson et al., 2000), GATA-2 y GATA-1 (Weiss et al., 1995), no se expresan en CMAMr indiferenciadas, tal como se muestra por análisis con matriz de ADNc. En tercer lugar, las condiciones de cultivo utilizadas para las CMAMr no promueven las CMH. En cuarto lugar, todos los intentos de inducir la diferenciación hematopoyética a partir de CMAMh in vitro, mediante el cultivo conjunto de CMAMh con citocinas y nutrientes promotores hematopoyéticos han fracasado (Reyes et al., 2001).

También se observaron niveles significativos de injerto de CMAMr en el hígado, intestino y pulmón. Se empleó inmunohistoquímica con tres colores para identificar las células hematopoyéticas (CD45⁺) y epiteliales (CK⁺) en los mismos cortes de tejido de hígado, intestino y pulmón. En el hígado, las células β -gal⁺ derivadas del donante formaron cordones de hepatocitos (CK18⁺CD45⁺ o albúmina⁺) y ocuparon aproximadamente un 5-10% de una sección dada de 5 μ m (Figs. 4K-M). Se identificaron claramente en las células epiteliales varias células hematopoyéticas CK18⁺CD45⁺ β -gal⁻ originarias del receptor. Las células albúmina⁺ β -gal⁺ y CK18⁺ β -gal⁺ se injertaron en cordones de hepatocitos que rodeaban los espacios portal, una pauta observada en la regeneración hepática a partir de células madre hepáticas y células ovales (Alison et al., 1998; Petersen et al., 1999). Esto y el hecho de que únicamente 5/20 cortes contuvieran células del donante, es consistente con la idea de que las células madre se injertan en algunas áreas del hígado, donde proliferan y se diferencian en hepatocitos, pero no en todas.

El injerto en el intestino también fue consistente con lo que se conoce acerca de las células madre epiteliales intestinales. En el intestino, cada cripta contiene una población de 4-5 células madre de vida larga (Potten, 1998). La progenie de estas células madre puede experimentar varios ciclos de división en las porciones media y superior de las criptas y dar lugar a células epiteliales que migran de manera ascendente, fuera de la cripta, a las vellosidades adyacentes. Las células epiteliales β -gal⁺panCK⁺CD45⁻ derivadas del donante cubrieron completamente varias vellosidades (Figs. 4O-P). En algunas vellosidades, las células β -gal⁺panCK⁺CD45⁻ constituyeron únicamente un 50% de la circunferencia (flechas sólidas, Fig. 4P) lo que sugiere el injerto en una pero no en ambas criptas. Se observaron claramente varias células β -gal⁺panCK⁻ en el núcleo de las vellosidades intestinales (flecha abierta, Fig. 4O). Estas células se tiñeron de manera conjunta para CD45 (Fig. 4P), lo que indica que son células hematopoyéticas derivadas del donante. En el pulmón, la mayoría de las células del donante dieron lugar a células epiteliales alveolares β -gal⁺panCK⁺CD45⁻ y en cambio la mayoría de las células hematopoyéticas fueron originarias del receptor (panCK⁺CD45⁻ β -gal⁻) (Fig. 4R).

Los niveles de injerto detectados por inmunohistoquímica fueron coherentes con los niveles determinados por Q-PCR para NEO (Tabla 4). Los niveles de injerto fueron similares en animales analizados tras 4-24 semanas tras la inyección i.v. de CMAM (Tabla 4).

No se observó contribución al músculo cardíaco o esquelético. Al contrario que para los tejidos epiteliales y el sistema hematopoyético, se apreció muy poco recambio celular o ninguno en el músculo cardíaco o esquelético, en ausencia de herida en el tejido. Por tanto, no se puede esperar una contribución significativa de las células madre a estos tejidos. Sin embargo, no se detectó injerto en la piel y riñón, dos órganos en los cuales las células epiteliales experimentan un recambio celular rápido. En los experimentos con inyección de blastocistos (Ejemplo 8) se muestra que las CMAMr se pueden diferenciar en esos tipos celulares; una explicación posible para la ausencia de injerto en estos órganos en receptores que ya han nacido es que las CMAMr no se dirigen a estos órganos, una hipótesis que se está evaluando en la actualidad. Aunque las CMAMr se diferenciaron en células similares al neuroectodermo ex vivo, no se apreció un injerto significativo de CMAMr en el cerebro y las pocas células del donante observadas en el cerebro no se marcaron conjuntamente con los marcadores neuroectodérmicos. Dos publicaciones recientes han demostrado que se pueden detectar células derivadas del donante con características neuroectodérmicas en el cerebro de animales que han sido objeto de un trasplante de médula ósea. Sin embargo, se empleó un régimen preparativo totalmente ablativo anterior al trasplante o el trasplante en animales recién nacidos, condiciones asociadas con daños en la barrera hematoencefálica. Se infundieron las células en animales adultos no irradiados o animales tratados con dosis de radiación bajas, donde la barrera hematoencefálica está intacta o dañada solamente en un grado mínimo. Esto puede explicar la falta de injerto de CMAMr en el SNC.

Las CMAM confluentes no se diferencian in vivo

Como control, se infundieron ROSA26-CMAM y se cultivaron hasta alcanzar la confluencia antes de la inyección. Las CMAM a las que se les permitió llegar a la confluencia perdieron su capacidad de diferenciarse ex vivo en células fuera del mesodermo y se comportaron como CMM clásicas (Reyes, M. et al. 2001). La infusión de 10⁶ CMAMr confluentes no dio lugar a niveles significativos de injerto de células del donante. Aunque se observaron algunas células β -gal⁺ en la MO, estas células no se marcaron conjuntamente con Abs anti-CD45, lo que indica que

las CMM pueden injertarse en los tejidos pero pierden su capacidad de diferenciarse en células específicas de los tejidos en respuesta a estímulos locales.

Las células derivadas de CMAM en médula ósea de ratón se pueden transferir en serie

Se evaluó la MO de ratón injertada con CMAM ROSA26 para determinar si contenían células que se pudieran injertar en receptores secundarios. $1,5 \times 10^7$ células de MO, recuperadas de los receptores primarios 11 semanas después de la infusión i.v. de CMAMr, se transfirieron a los receptores NOD-SCID irradiados secundarios (Tabla 4: animales SR-1 y SR-2). Después de 7 y 10 semanas, se sacrificaron los receptores secundarios y se analizaron la sangre, MO, bazo, hígado, pulmón e intestinos del animal receptor para detectar el injerto de células ROSA26 del donante por inmunohistoquímica y por Q-PCR para detectar el gen NEO. En los receptores secundarios se observó una pauta de injerto similar a la de los receptores primarios. Un 4-8% de las células de MO, de bazo y células PB fueron $\beta\text{-gal}^+\text{CD45}^+$, un 6 y 8% de las células epiteliales intestinales fueron $\beta\text{-gal}^+\text{pan-CK}^+$ y un 4 y 5% de las células epiteliales pulmonares fueron $\beta\text{-gal}^+\text{pan-CK}^+$. Los niveles de injerto en el hígado de los receptores secundarios fue menor que en los receptores primarios (un 1 y 3% vs. a un 5 y 8% de $\beta\text{-gal}^+\text{CK18}^+$). Esto sugiere que las CMAMr pueden persistir en la MO del receptor primario y diferenciarse en células hematopoyéticas así como en células epiteliales cuando se transfieren a un receptor secundario.

Las células derivadas de CMAM pueden producir insulina in vivo. Las CMAM de ratones ROSA26 se inyectaron en ratones NOD-SCID irradiados tal como se ha descrito en la presente. Las células derivadas de CMAM resultantes se tiñeron conjuntamente para LacZ e insulina en un modelo de diabetes inducida por estreptozotocina.

Resumen

Una de las preguntas clave en la "plasticidad de las células madre" es si las CMAMr del donante diferenciadas e injertadas son funcionales. Los resultados descritos en la presente muestran que un animal desarrolló un linfoma en el timo y bazo tras 16 semanas, como se observa comúnmente en ratones NOD-SCID de edad avanzada (Prochazka et al., 1992). El análisis fenotípico mostró que este linfoma de linfocitos B se derivó del receptor: las células CD19⁺ fueron $\beta\text{-gal}^-$. Aproximadamente un 40% de las células CD45⁺vWF⁺ en el sistema vascular del tumor se tiñó con Abs anti- $\beta\text{-gal}$, lo que indica que la neoangiogénesis en el tumor se derivó en parte de CMAMr del donante (Fig. 4T). Esto sugiere que las CMAM dan lugar a una progenie funcional in vivo. Del mismo modo, niveles elevados de injerto y diferenciación de CMAMr en órganos radiosensibles, tales como el sistema hematopoyético y el epitelio intestinal (Tabla 4, $p < 0,001$), tras una dosis baja de radiación sugiere que las CMAMr pueden contribuir funcionalmente a los tejidos del receptor.

Estos resultados muestran que las CMAM de mamíferos se pueden purificar, expandir ex vivo, e infundir i.v., dirigirse a varios sitios del cuerpo, injertarse en numerosos órganos y que las células están vivas en estos diferentes órganos un mes o más. Tales células del donante indiferenciadas y la progenie diferenciada se encuentran, en virtud del marcador fluorescente, en órganos que incluyen, sin carácter limitante, la MO, bazo, hígado y pulmón. Estas células se pueden emplear para repoblar uno o más compartimentos para aumentar o restaurar la función del órgano o célula.

Ejemplo 7. Demostración de la eritropoyesis y hematopoyesis in vitro

Las CMAM de MO humana se diferencian en el nivel de única célula en estirpes neuroectodérmicas, endodérmicas y muchas estirpes mesodérmicas, incluidas las células endoteliales. Debido a que el endotelio y la sangre están relacionados en la ontogenia de una manera muy estrecha, se puede suponer que las CMAM se pueden diferenciar en células hematopoyéticas. CMAM humanas transducidas con eGFP, que carecen de GlyA, CD45 y CD34 ($n = 20$), se cultivaron junto con la línea celular mesodérmica del saco vitelino de ratón, YSM5, como suspensión de agregados celulares durante 6 días en medio exento de suero suplementado con 10 ng/mL de FCFb y FCEV. Tras seis días, únicamente permanecían las células eGFP⁺ (es decir, la progenie de CMAM) y las células YSM5 habían perecido.

Se transfirieron las células restantes a cultivos de metilcelulosa que contenían un 10% de suero bovino fetal suplementado con 10 ng/mL de proteína morfogénica de hueso (PMH)₄, FCEV, FCFb, factor de células madre (FCM), Flt3L, hiper IL6, trombopoyetina (TPO) y eritropoyetina (EPO) durante 2 semanas. En estos cultivos se detectaron tanto las células eGFP⁺ adherentes como células pequeñas, redondas y no adherentes, las cuales formaron muchas colonias uniéndose a las células adherentes. Se recogieron de manera separada las fracciones adherente y no adherente y se cultivaron en medio que contenía un 10% de FCS con 10 ng/mL de FCEV y FCFb durante 7 días. Las células adherentes presentaron una tinción positiva para vWF, formaron tubos vasculares cuando se colocaron en placas en MEC y fueron capaces de incorporar a-LDL, lo que indica su naturaleza endotelial. Un 5-50% de las células no adherentes presentaron una tinción positiva para el HLA de clase I y GlyA específica humana por citometría de flujo. Se seleccionaron las células Gly-A⁺/(HLA de clase I)⁺ por FACS. En la tinción Wright-Giemsa, estas células exhibieron la pauta de tinción y morfología características de los eritroblastos primitivos. Las células fueron benzidina⁺ y (Hb humana)⁺ en la detección con inmunoperoxidasa. Por RT-PCR estas células expresaron la Hb-e específica humana, pero no la Hb-a.

5 Cuando se colocaron de nuevo en placas para el ensayo en metilcelulosa con un 20% de FCS y EPO, se observaron pequeñas colonias eritroides tras 10 días y un 100% de estas colonias presentaron una tinción positiva para la Hb y GlyA específicas humanas. Como la selección de las CMAM depende de la eliminación de las células CD45⁺ y GlyA⁺ de la MO y las células CMAM cultivadas fueron CD45⁻ y GlyA⁻ en todas las ocasiones en que se examinaron utilizando tanto el análisis con matriz de ADNc como FACS, la contaminación de CMAM con células hematopoyéticas es muy improbable.

10 **Ejemplo 8. Prueba in vivo de la naturaleza multipotente de las CMAM tal como lo muestra el quimerismo de múltiples órganos tras la inyección de las células con blastocistos**

15 La capacidad de las CMAM para proliferar y diferenciarse in vivo en los tipos celulares apropiados es importante para las aplicaciones terapéuticas de estas células. Hasta este punto, las únicas células que deberían ser capaces de contribuir a todo el conjunto de tejidos y órganos en el cuerpo son las células ME. Con el fin de analizar si las CMAM podían mostrar la plena capacidad de las células ME, se sometieron a ensayo para determinar su contribución a la formación de varios tejidos introduciéndolas en los blastocistos tempranos y observando el destino de su progenie.

20 Se generaron CMAM a partir de médula de ratones ROSA26 que son transgénicos para el gen de la β -galactosidasa (β -gal) (Rafii, S., et al., 1994, Blood. 84:10-13) y se expandieron tal como se describe en el Ejemplo 1. Una o 10-12 CMAM ROSA26 obtenidas tras 55-65 DP se microinyectaron en 88 y 40 blastocistos C57BL/6 de 3,5 días, respectivamente. Los blastocistos (8/madre) se transfirieron a 16 madres subrogadas y se permitió que los ratones se desarrollaran y nacieran tal como se muestra en la Tabla 5.

25 **Tabla 5. Grado de quimerismo tras la inyección de CMAM en el blastocisto**

CMAM/ blastocisto	Camadas nacidas	Nº. de cachorros nacidos	Positivo para NEO por Q-PCR				
			0%	1-10%	10-20%	20-40%	>40%
10-12	4/11	22	5/22 (23%)	13/22 (59%)	2/22 (9%)	1/22 (4,5%)	1/22 (4,5%)
1	3/5	15	8/15 (53%)	5/15 (33%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)	2/15 (13%)

30 Nacieron siete camadas, en consonancia con la tasa de nacimiento observada en otros estudios durante este período. El número de ratones por camada varió entre 1 y 8, con un total de 37 ratones. Los animales que nacieron a partir de blastocistos microinyectados fueron de un tamaño similar a los animales normales y no presentaron ninguna anomalía patente.

35 Tras cuatro semanas, se evaluaron los animales para determinar su quimerismo recortando sus colas y evaluando la contribución de las células que contenían el transgén β -gal/NEO a las colas mediante Q-PCR para determinar NEO. Se determinó el porcentaje de quimerismo comparando el número de copias de NEO en las muestras de ensayo con aquellas del tejido de ratones ROSA26 de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (7700 ABI PRISM Detector Software 1.6). Se pudo detectar quimerismo en un 70% de los ratones derivados de blastocistos en los cuales se habían inyectado de 10 a 12 CMAM y en un 50% de los ratones derivados de blastocistos microinyectados con 1 CMAM (Tabla 5). El grado de quimerismo estuvo comprendido entre un 0,1% y >45%. Después de 6 a 20 semanas, se sacrificaron los animales. Se congelaron algunos ratones en nitrógeno líquido y se realizaron cortes finos tal como se describe. Los cortes de los ratones completos se tiñeron con X-Gal. A continuación se ensamblaron mil conjuntos de imágenes digitales que cubrían completamente cada corte para crear una imagen compuesta de cada corte de ratón completo. En un animal no quimérico representativo (mediante Q-PCR para NEO) derivado a partir de un blastocisto en el cual se inyectó una única CMAM, no se apreció tinción para X-Gal. En cambio, se determinó que el animal era quimérico en un 45% por R-PCR para NEO mediante el análisis por el corte de la cola y que hubo contribución en todos los tejidos somáticos de una única CMAM derivada de ratones ROSA26.

50 Para otros animales, se recolectaron múltiples órganos y se analizaron para detectar la presencia de células derivadas de CMAM por tinción con X-GAL, tinción con un anticuerpo anti- β -gal-FITC y Q-PCR para NEO. Los animales que presentaron células NEO⁺ en los corte de la cola presentaron contribución de las CMAM derivadas de ROSA26 en todos los tejidos, incluidos el cerebro, retina, pulmón, músculo esquelético y cardíaco, hígado, intestino, riñón, bazo, MO, sangre y piel tal como muestra la tinción con X-GAL y la tinción con un anticuerpo anti- β -gal-FITC.

55 Se detectó quimerismo por tinción con X-Gal y tinción con anti- β -gal en los animales generados a partir de blastocistos microinyectados con CMAM ROSA26. Las células β -gal⁺ expresaron marcadores típicos del tejido en el cual se habían incorporado. Las células β -gal⁺ se tiñeron conjuntamente con anti- β -gal⁺ FITC y anti-NF200 o GFAP y TOPRO3 (examinado con una amplificación 20X) para NF200 y GFAP en el sistema nervioso central y para distrofina en el músculo esquelético. Se tiñó el tejido pulmonar con anti- β -gal-FITC y pan-CK en los alveolos y

bronquios (también TOPRO3) (examinado con una amplificación 20X). El músculo esquelético teñido con anti-β-gal-FITC, distrofina-PE y TOPRO3 se examinó con una amplificación 20X. El corazón se tiñó con anti-p-gal-FITC y troponina cardíaca-I-Cy3, TOPRO3 y se examinó con una amplificación 20X. El hígado se tiñó con anti-β-gal-FITC y pan-CK-PE y TOPRO3 (se examinó con una amplificación 40X y una amplificación 10X). Se tiñó el intestino con anti-β-gal-FITC, pan-CK-PE y TOPRO3 y se examinó con una amplificación 20X. Se tiñó el riñón con anti-β-gal-FITC (glomérulos, túbulos) y se examinó con una amplificación 20X. La tinción de la médula se examinó con anti-β-gal-FITC y CD45-PE, GRI-PE y MACI-PE. La tinción del bazo se examinó con anti-β-gal-FITC y CD45-PE, CD3-PE y CD19-PE. Los niveles de injerto por Q-PCR para NEO fueron coherentes con aquellos estimados por tinción con X-GAL y anti-β-gal-FITC.

Resumen

Estos datos demuestran por primera vez que las CMAM únicas derivadas de MO se integran en el ratón en desarrollo, dan lugar a células con varios destinos y contribuyen a la generación de todos los tejidos y órganos de las tres capas germinales del ratón. Como todos los animales vivos, independientemente del grado de quimerismo, presentaron órganos con un funcionamiento normal, estos estudios también sugieren que las CMAM se pueden diferenciar in vivo en células funcionales de las tres capas germinales. Aún no ha evaluado si las CMAM contribuyen a las células germinales cuando se inyectan en un blastocisto o cuando se inyectan después del nacimiento.

Ejemplo 9. Origen de los progenitores endoteliales

La vasculogénesis, la diferenciación in situ de los progenitores endoteliales primitivos, denominados angioblastos, en células endoteliales que se agregan en un plexus capilar primario es responsable del desarrollo del sistema vascular durante la embriogénesis (Hirashima et al., 1999). En cambio, la angiogénesis, definida como la formación de nuevos vasos sanguíneos por un proceso de brote a partir de los vasos preexistentes, ocurre tanto durante el desarrollo como en la vida posterior al nacimiento (Holash et al., 1999; Yang et al., 2001). Hasta recientemente, se pensaba que la formación de vasos sanguíneos en la vida posterior al nacimiento estaba mediada por el brote de células endoteliales a partir de vasos existentes. Sin embargo, estudios recientes han sugerido que las “células madre” endoteliales pueden mantenerse en la vida adulta, donde contribuyen a la formación de nuevos vasos sanguíneos (Peichev et al., 2000; Lin et al., 2000; Gehling et al., 2000; Asahara et al., 1997; Shi et al., 1998), lo que sugiere que durante el desarrollo la neoangiogénesis en el adulto puede depender, al menos en parte, de un proceso de vasculogénesis. Se han aislado precursores de células endoteliales de MO y sangre periférica (Peichev et al., 2000; Watt et al., 1995). Se desconoce la ontogenia de estos progenitores endoteliales.

Durante el desarrollo, las células endoteliales se derivan del mesodermo. El receptor 2 de FCEV, Fik1, caracteriza los hemangioblastos, una célula madre bipotente que se encuentra en la región aorta-gónada-mesonefros (Medvinsky et al., 1996; Fong et al., 1999; Peault, 1996) y en el hígado fetal (Fong et al., 1999) y el compromiso de los cuerpos embrioides en la formación de los hemangioblastos está acompañada por la expresión de Fikl (Choi et al., 1998; Choi, 1998). Se desconoce si los hemangioblastos se mantienen en la vida adulta y únicamente se han documentado CMH y los progenitores endoteliales. Como los hemangioblastos, los progenitores endoteliales expresan Fikl (Peichev et al., 2000) y un informe sugiere que las CMH en la vida posterior al nacimiento expresan Fik1 (Ziegler et al., 1999). Durante la embriología, el compromiso de los hemangioblastos en la generación de la estirpe endotelial se caracteriza por la expresión secuencial de la VE-cadherina, CD31 y poco después CD34 (Nishikawa et al., 1998; Yamashita et al., 2000). En la vida posterior al nacimiento, se han seleccionado progenitores endoteliales a partir de MO y sangre utilizando Abs contra AC133, Fik1, CD34 y el Ab H1P12 (Peichev et al., 2000; Lin et al., 2000; Gehling et al., 2000). También se ha detectado AC133 en otras células, incluidas CMN (Uchida et al., 2000) y células epiteliales gastrointestinales (Corbeil et al., 2000). Tras la diferenciación en un endotelio maduro, se pierde rápidamente el receptor AC133 (Peichev et al., 2000; Gehling et al., 2000). Otro receptor detectado en las células endoteliales circulantes es una mucina, MUC18, reconocida por el Ab H1P12 (Lin et al., 2000). MUC18 se pierde tras la diferenciación de los progenitores endoteliales en endotelio. Se expresa CD34 en los progenitores endoteliales, así como en los progenitores hematopoyéticos (Peichev et al., 2000; Baumhueter et al., 1994) y células ovas hepáticas (Crosby et al., 2001). Este antígeno también se pierde tras la diferenciación de los progenitores endoteliales en endotelio. La mayoría de las células endoteliales maduras, excepto las células endoteliales microvasculares, ya no expresan CD34.

Se describe aquí por primera vez, la generación in vitro de un amplio número de células endoteliales que se injertan in vivo y contribuyen a la neoangiogénesis a partir de una CMAM. Las CMAM se pueden expandir en cultivo durante >80 DP y las células endoteliales generadas a partir de CMAM se pueden expandir durante al menos 20 DP adicionales. Las CMAM pueden, por tanto, ser una fuente ideal de células endoteliales para terapias clínicas. Además, ya que las CMAM son ontogénicamente menos maduras que el “angioblasto”, este modelo debería ser útil para caracterizar el compromiso endotelial y la diferenciación. Las CMAMh se diferencian en células con características fenotípicas del endotelio.

Se obtuvieron y cultivaron las CMAM tal como se describe en el Ejemplo 3. Para inducir la diferenciación endotelial, se colocaron de nuevo las CMAM en placas con una concentración de 2×10^4 células/cm² en pocillos recubiertos con FN en medio de expansión exento de suero sin FCE ni FCDP-BB pero con 10 ng/mL de FCEV. En algunos

casos se añadió FCS. Se mantuvieron los cultivos renovando el medio cada 4-5 días. En algunos casos, se subcultivaron las células tras el 9.º día con una dilución 1:4 en las mismas condiciones de cultivo que para los 20+ DP.

5 Con el fin de definir más ampliamente la diferenciación endotelial a partir de las CMAM, se llevaron a cabo análisis inmunohistoquímicos y FACS de las células tras 3-18 días. La expresión de Flk1 y Flt1 en CMAM indiferenciadas fue baja, fue máxima el 9.º día y se mantuvo hasta el 18.º día. La VE-cadherina, presente en MO o progenitores endoteliales sanguíneos (Peichev et al., 2000; Nishikawa et al., 1998) no se expresó en CMAM indiferenciadas pero se expresó tras 3 días de cultivo con FCEV y se mantuvo hasta el 18.º día. Las CMAM expresaron niveles bajos de AC133, detectado tanto en progenitores hematopoyéticos como endoteliales (Peichev et al., 2000; Gehling et al., 10 2000) pero dejó de ser detectable después del 3.º día. CD34, presente en progenitores hematopoyéticos y endoteliales (Peichev et al., 2000; Asahara et al., 1997; Rafii et al., 1994) no estuvo presente en CMAM indiferenciadas (Fig. 4A) pero se expresó desde el 9.º día hasta el 18.º día. La mucina, MUC18, reconocida por el Ab H1P12 se ha utilizado para purificar los progenitores endoteliales de la sangre (Lin et al., 2000). Aunque las CMAM no se tiñeron con H1P12, las CMAM tratadas con FCEV durante 9 días presentaron una tinción positiva, pero el día 15 18.º la expresión se había perdido.

La integrina específica del endotelio, $\alpha v\beta 3$ (Eliceiri et al., 2000) no estuvo presente en CMAM indiferenciadas, mientras que $\alpha v\beta 5$ se expresó con unos niveles muy bajos. La expresión de las integrinas se incrementó progresivamente durante la diferenciación y el día 14.º había alcanzado su grado máximo (Fig. 5). Los receptores de la tirosina-cinasa, Tie y Tek, importantes para la angiogénesis pero no para la diferenciación celular endotelial (Partanen et al., 1999) no se expresaron en las CMAM. Se pudo apreciar la expresión de Tek después del 3.º día y de Tie después del 7.º día (fig. 6). Las CMAM tampoco expresan vWF, pero se expresó vWF a partir del 9.º día (Rosenberg et al., 1998; Wagner et al., 1982). Más marcadores endoteliales maduros, incluidos CD31, CD36, CD62-P (Tedder et al., 1995) (Fig. 7) y las proteínas de las uniones de adhesión ZO-1, catenina- β y catenina- γ (Fig. 5) se detectaron después del 14.º día (Li et al., 1990; Van Rijen et al., 1997; Petzelbauer et al., 2000). Ni MACV ni CD62-E mostraron un nivel alto de expresión en ningún momento de la diferenciación, a menos que se activara el endotelio con la IL-1 α , tal como se describe posteriormente. La diferenciación en endotelio se asoció con la adquisición de la microglobulina- $\beta 2$ y niveles bajos de los antígenos de clase I de HLA, pero no los de clase II.

30 Se ha publicado anteriormente que la diferenciación endotelial únicamente se puede obtener a partir de CMAM expandidas con una cantidad de FCS del 2% o menor, pero no cuando se expanden con un 10% de FCS (Reyes et al., 2001) ya que concentraciones más elevadas de FCS promueven el crecimiento de CMM clásicas que se diferencian solamente en osteoblastos, condroblastos y adipocitos (Reyes et al., 2001; Pittenger et al., 1999). Cuando FCS estuvo presente durante los 7 primeros días de la diferenciación, no se pudo inducir la diferenciación endotelial. Cuando se indujo la diferenciación de CMAM no confluentes ($\leq 1 \times 10^4$ células/cm²) no se apreció endotelio. Cuando se subcultivaron las CMAM 9 días después de la exposición a FCEV utilizando medio exento de suero con 10 ng/mL de FCEV, las células fueron capaces de experimentar al menos 12 DP adicionales. Cuando se añadieron un 10% de FCS y 10 ng/mL de FCEV al medio para el subcultivo, las células endoteliales derivadas de CMAM fueron capaces de experimentar 20+ DP adicionales, independientemente del número de DP que las CMAM habían experimentado.

En comparación con las CMAM indiferenciadas, las células endoteliales fueron mayores y presentaron una relación núcleo/citoplasma menor. Los resultados fueron similares cuando se utilizaron CMAM de cultivos que habían experimentado 20 (n=30) o 50+ (n=25) DP.

Características funcionales de endotelio derivado de CMAM

50 Se estudió si la progenie diferenciada de CMAMh inducida con FCEV poseía las características funcionales de las células endoteliales. Las células endoteliales responden a la hipoxia aumentando de manera regulada la expresión del FCEV así como la de los receptores de FCEV, Flk1 y los receptores de la angiogénesis, Tie-1 y Tek (Kourembanas et al., 1998). Se incubaron CMAMh y células endoteliales derivadas de CMAMh a 37 °C con un 20% o 10% de O₂ durante 24 h. Se tiñeron las células con Abs contra Flk1, Flt1, Tek e IgG como control, se fijaron en paraformaldehído al 2% y se analizaron por citometría de flujo. Además, se midieron las concentraciones de FCEV en los sobrenadantes del cultivo utilizando un kit de ELISA (AP biothech, Piscataway, NJ). Se sometieron células endoteliales derivadas de CMAM y CMAM indiferenciadas a condiciones hipóxicas durante 24 h.

60 La expresión de Flk1 y Tek aumentó de manera significativa en células endoteliales derivadas de CMAM sometidas a hipoxia (Fig. 7), mientras que los niveles de estos receptores permanecieron inalterados en las CMAM indiferenciadas. Además, los niveles de FCEV en los sobrenadantes del cultivo de cultivos endoteliales hipóxicos se multiplicó por 4 (Fig. 7B) mientras que los niveles de FCEV en los cultivos de CMAM sometidas a hipoxia permanecieron inalterados.

65 A continuación se estudió si las células endoteliales derivadas de CMAM aumentarían de manera regulada la expresión de antígenos del HLA y de ligandos de adhesión celular en respuesta a citocinas inflamatorias tales como la IL-1 α (Meager, 1999; Steeber et al., 2001). Se incubaron 10⁶ CMAM y células endoteliales derivadas de CMAM

con 75 ng/mL de IL-1 α (R&D Systems) en medio exento de suero durante 24 h. Se fijaron las células en paraformaldehído al 2% y se tiñeron con Abs contra el HLA de clase I y clase II, microglobulina- β_2 , vWF, CD31, MACV, CD62E y CD62P o Abs de control y se analizaron utilizando un FACScalibur (Becton Dickinson).

- 5 Se observaron niveles significativamente aumentados de HLA de clase I y de clase II, microglobulina- β_2 , MACV, MACE, CD62E, CD62P mediante el análisis FACS (Fig. 7C) en células endoteliales. En cambio, en las CMAM indiferenciadas solo se observó aumento regulado de Flk.

10 Otra característica de las células endoteliales es que incorporan LDL (Steinberg et al., 1985). Esto se estudió incubando CMAM en las que se había inducido la diferenciación con FCEV durante 2, 3, 5, 7, 9, 12, 15 y 21 con dil-acil-LDL. El kit de tinción de dil-Ac-LDL se adquirió de Biomedical Technologies (Stoughton, MA). Se llevó a cabo el ensayo siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se marcaron conjuntamente las células con Abs anti-Tek, -Tie-1 o -vWF. Al cabo de 3 días, se detectó la expresión de Tek pero no la incorporación de a-LDL. Al cabo de 7 días, las células expresaron Tie-1 pero no incorporaron cantidades significativas de a-LDL. Sin embargo, la adquisición de la expresión de vWF el 9.º día se asoció con la incorporación de aLDL (Fig. 6B).

15 Las células endoteliales contienen vWF acumulado en los cuerpos de Weibel-Pallade que se libera in vivo cuando se activa el endotelio (Wagner et al., 1982). Esto se puede inducir in vitro estimulando las células con histamina (Rosenberg et al., 1998), lo cual da como resultado también la activación de la célula citoesquelética (Vischer et al., 2000). Se colocaron en placas células endoteliales derivadas de CMAM con una confluencia elevada (10^4 células/cm 2) en portaobjetos con pocillos recubiertos de FN. Después de 24 h, se trataron las células con histamina 10 μ M (Sigma) en medio exento de suero durante 25 min y se tiñeron con Abs contra vWF y miosina. Se fijaron las células tratadas y sin tratar con metanol a -20 °C durante 2 min, se tiñeron con Abs contra vWF y miosina y se analizaron utilizando microscopía confocal y/o de fluorescencia. El vWF estuvo presente a través del citoplasma de las células endoteliales no tratadas. El citoplasma de las células endoteliales tratadas con histamina contuvo una cantidad significativamente menor de vWF y vWF únicamente fue detectable en la región perinuclear, lo que probablemente representa el vWF presente en el retículo plasmático (Fig. 6A). El tratamiento con histamina provocó un ensanchamiento de las uniones de abertura y cambios citoesqueléticos con un número mayor de fibras de estrés de miosina (Fig. 6A).

20 Finalmente, se estudiaron las células endoteliales para determinar si podían formar “tubos vasculares” cuando se colocaron en placas en Matrigel™ o en matriz extracelular (MEC) (Haralabopoulos et al., 1997). Se añadieron 0,5 mL de matriz extracelular (Sigma) por pocillo a una placa de 24 pocillos y se incubaron durante 3 h a 37 °C. Se añadieron 10^4 CMAM y células endoteliales derivadas de CMAM por pocillo en 0.5 mL de medio exento de suero y con FCEV y se incubaron a 37 °C. Tal como se muestra en la Fig. 6C, el cultivo de células endoteliales derivadas de CMAM en MEC dio como resultado la formación de tubos vasculares en 6 horas o menos.

Las células endoteliales derivadas de CMAMh contribuyen a la angiogénesis tumoral in vivo

40 Se estableció una colonia reproductora de ratones NOD-SCID a partir de ratones obtenidos de los Laboratorios Jackson (Bar Harbor, ME). Se mantuvieron los ratones en condiciones exentas de patógenos específicos y se mantuvieron con agua acidificada y comida esterilizada en autoclave. Se les suministró dos veces por semana 60 mg de trimetoprima y 300 mg de sulfametoxazol (Hoffmann-La Roche Inc., Nutley, NJ) por 100 mL de agua.

45 Se les implantaron tres carcinomas pulmonares de Lewis subcutáneamente en el hombro. 3 y 5 días después del implante del tumor, se inyectaron a los ratones $0,25 \times 10^6$ células endoteliales derivadas de CMAM humanas o fibroblastos de prepucio humanos a través de una inyección en la vena de la cola. Tras 14 días, se sacrificaron los animales, se recuperaron los tumores y se congelaron utilizando el compuesto OCT (Santura Finetek USA Inc, Torrance, CA) a -80 °C. Además, las orejas que se perforaron para etiquetar a los ratones también se recogieron y congelaron utilizando el compuesto OCT a -80 °C. Se dispusieron cortes de cinco μ m de grosor sobre portaobjetos de vidrio y se fijaron y tiñeron como se describe a continuación.

50 El análisis asistido por ordenador de la longitud y número de ramificaciones cuyo recuento se llevó a cabo en cinco cortes de cada tumor mostraron que los tumores en los ratones que recibieron células endoteliales derivadas de CMAM humanas poseían una masa vascular mayor en una proporción $1,45 \pm 0,04$ respecto a los tumores en ratones de control que lo hecho con Abs anti-microglobulina- β_2 humana o HLA de clase I, combinados con Abs anti-ratón-anti-CD31 y Abs anti-vWF, anti-Tek o anti-Tie-1, lo cuales reconocen células endoteliales tanto humanas como de ratón. Estos estudios iniciales mostraron que algunos vasos sanguíneos en el tumor contenían células positivas para HLA de clase I o anti-microglobulina- β_2 humana que marcaban conjuntamente vWF, Tie o Tek pero no CD31 de ratón, lo que indica que las células endoteliales derivadas de CMAM contribuían a la neoangiogénesis tumoral in vivo.

55 Para estudiar mejor el grado de contribución, se obtuvieron 35 preparaciones secuenciales de 5 μ m y se tiñeron de manera alternativa bien con anti-microglobulina- β_2 humana-FITC bien con anti-CD31 de ratón-Cy5 y anti-vWF-Cy3. Se examinaron todas las preparaciones por microscopía confocal. A continuación se ensamblaron las diferentes figuras en 3D para determinar la contribución relativa de células endoteliales murinas y humanas a los vasos

tumorales. Cuando se analizaron los tumores obtenidos a partir de animales inyectados con células endoteliales derivadas de CMAM humanas, aproximadamente un 35% de los vasos tumorales fueron positivos para anti-microglobulina- β_2 humana así como para vWF mientras que aproximadamente un 40% de las células endoteliales presentaron una tinción positiva con Abs anti-CD31 de ratón (Figs. 8A-G). Los tumores en animales que no recibieron células endoteliales ni recibieron fibroblastos humanos no contuvieron células endoteliales que presentaran una tinción positiva con los Abs anti-microglobulina- β_2 o anti-HLA de clase I.

También se analizó si las células endoteliales derivadas de CMAM contribuían a la angiogénesis de la curación de una herida. A continuación el área de la oreja que había sido perforada para etiquetar al ratón se examinó. La neoangiogénesis en las heridas de la oreja se debió en parte a las células endoteliales derivadas de CMAM. El porcentaje de células endoteliales humanas presentes en la herida de la piel curada fue del 30-45% (Fig. 9H) y similar al de los vasos sanguíneos en el tumor.

Las CMAMh indiferenciadas se diferencian en células endoteliales in vivo

Se inyectaron i.v. 10^6 CMAM indiferenciadas en ratones NOD-SCID de 6 semanas de edad. Se mantuvieron los animales durante 12 semanas y a continuación se sacrificaron. En un animal se detectó un tumor tímico, el cual se observa comúnmente en ratones NOD-SCID de edad avanzada (Prochazka et al., 1992). Se extrajo el timo y se congeló en compuesto OCT a -80 °C. Se prepararon cortes de diez μm de grosor de los tejidos sobre portaobjetos de vidrio y se fijaron y tiñeron como se describe a continuación.

Todas las células hematopoyéticas presentaron una tinción positiva para CD45 de ratón pero no para CD45 humano, lo que indica su origen murino. A continuación se tiñó el tumor con un Ab anti-microglobulina- β_2 humana-FITC y un Ab anti-vWF-Cy3 que reconoce tanto las células endoteliales de ratón como las humanas. Aproximadamente un 12% del sistema vascular se derivó de CMAMh (Fig. 9I). Estos estudios además confirman que los elementos hematopoyéticos no son de origen humano, ya que no se detectó microglobulina- β_2 humana fuera de las estructuras vasculares.

Inmunohistoquímica y análisis de los datos

Cultivos in vitro: CMAM indiferenciadas o CMAM inducidas a diferenciarse en endotelio durante 2-18 días, colocadas en portaobjetos con pocillos recubiertos con FN se fijaron con paraformaldehído al 2% (Sigma) durante 4 minutos a temperatura ambiente. Para la tinción del citoesqueleto se fijaron portaobjetos con pocillos con metanol durante 2 min. a -20 °C. Para los ligandos intracelulares, se permeabilizaron las células con Tritón-X 0,1 (Sigma) durante 10 min. y se incubaron de manera secuencial durante 30 h de cada vez con un anticuerpo primario (Ab) y con un Ab anti-IgG de conejo, cabra o ratón conjugado con FITC, PE o Cy5. Entre cada paso, las preparaciones se lavaron con PBS+1% de BSA. Los Abs primarios contra CD31, CD34, CD36, CD44, HLA de clase I y II, microglobulina- β_2 se utilizaron con una dilución 1:50. Los Abs primarios contra MACV, MAIC, VE-cadherina, selectinas, HIP12, ZO-1, conexina-40, conexina-43, MUC18, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, catenina- β y catenina- γ (Chemicon) y Tek, Tie, vWF (Santa Cruz) se utilizaron con una dilución 1:50. Las fibras de estrés se tiñeron con Abs contra miosina (cadena ligera 20 kD, clon n.º MY-21; 1:200). Los Abs secundarios se adquirieron de Sigma y se utilizaron con las siguientes diluciones: anti-IgG de cabra-Cy-3 (1:40), anti-IgG de cabra-FITC (1:160), anti-IgG de ratón-Cy-3 (1:150) y anti-IgG de ratón-FITC (1:320), anti-conejo-FITC (1:160) y anti-conejo-Cy-3 (1:30). TOPRO-3 se adquirió de Sigma. Las células se examinaron por microscopía de fluorescencia utilizando una mira Zeiss Axiovert (Carl Zeiss, Inc., Thomwood, NY) así como por microscopía de fluorescencia confocal utilizando un microscopio confocal 1024 (Olympus AX70, Olympus Optical Co. LTD, Japón).

Tumores o tejido normal: Se cortó el tejido en cortes de 5-10 μm de grosor utilizando un criostato. Se fijaron los cortes con acetona durante 10 min a temperatura ambiente y se permeabilizaron con Tritón X 0,1 durante 5 min. Se incubaron las preparaciones durante toda la noche para vWF, Tie o Tek, seguido de una segunda incubación con Abs anti-IgG de conejo, cabra o ratón conjugados con FITC, PE o Cy5 y una incubación secuencial con Abs contra CD45 de ratón-PE o CD45 humano-FITC, microglobulina- β_2 humana-FITC, CD31 de ratón-FITC o TOPRO-3 durante 60 minutos. Entre cada paso las preparaciones se lavaron con PBS + BSA al 1%. Se examinaron las preparaciones por microscopía de fluorescencia utilizando una mira Zeiss Axiovert así como por microscopía de fluorescencia confocal utilizando un microscopio confocal 1024. La reconstrucción 3D consistió en la recogida de fotos confocales de 0,5 μm secuenciales de 35 preparaciones de 5 μm de grosor hasta un total de 350 fotos. Las preparaciones se tiñeron con vWF-Cy3 y de manera alternativa se tiñeron dos veces con microglobulina- β_2 humana-FITC o CD31 de ratón-FITC. Se alinearon las fotos de cada preparación con las de la siguiente preparación con el software Metamorph (Universal Imaging Corp) y la reconstrucción 3D se llevó a cabo con el software 3D Doctor (Able software Corp).

Se calculó el volumen de contribución relativa de células endoteliales murinas (coloreadas falsamente de azul) y humanas (verde) al vaso 3D en forma de píxeles cúbicos de cada color. También se calculó el área de cada color en forma de píxeles cuadrados en 4 vasos a lo largo de las 35 preparaciones para obtener un porcentaje preciso de la contribución. También se calculó el área de cada color en preparaciones alternadas de cuatro tumores diferentes.

Resumen

El hallazgo central de este estudio es que las células que se purifican conjuntamente con CMM de MO poseen la capacidad de diferenciarse en células endoteliales que poseen características funcionales in vitro indistinguibles de las características de las células endoteliales maduras. También se muestra que tales células endoteliales contribuyen a la neoangiogénesis in vivo en el establecimiento de la curación de la herida y la tumorigénesis, y que CMAM indiferenciadas pueden responder a estímulos locales in vivo para diferenciarse en células endoteliales que contribuyen a la angiogénesis tumoral. Como la misma célula que se diferencia en endotelio también se diferencia en otros tipos celulares mesodérmicos, así como células de origen no mesodérmico, la célula definida aquí precede al angioblasto e incluso el hemangioblasto en la ontogenia.

También se ha demostrado que las CMAM se diferencian en células que expresan marcadores de células endoteliales, pero se prueba que las CMAM inducidas por el FCEV funcionan como células endoteliales. Las células endoteliales modifican lipoproteínas durante el transporte en la pared arterial (Adams et al., 2000). Las células endoteliales mantienen una barrera de permeabilidad a lo largo de las uniones intercelulares que se ensancha cuando se exponen a fuerzas hemodinámicas o agentes vasoactivos, tales como la histamina (Rosenberg et al., 1998; Li et al., 1990; Van Rijen et al., 1997; Vischer et al., 2000). Las células endoteliales liberan moléculas protrombóticas tales como vWF, factor tisular y el inhibidor del activador del plasminógeno para prevenir la hemorragia (Vischer et al., 2000) y regular la salida de leucocitos cambiando los niveles de expresión de moléculas de adhesión en respuesta a la inflamación (Meager, 1999; Steeber et al., 2001). El endotelio también reacciona a la hipoxia produciendo FCEV y expresando el receptor del FCEV con el propósito de incrementar la densidad vascular (Kourembanas et al., 1998). Por tanto, se ha demostrado que las células endoteliales generadas a partir de CMAM pueden llevar a cabo todas estas tareas cuando se han estudiado in vitro.

Finalmente, se ha probado que las células endoteliales derivadas de CMAM generadas in vitro responden a estímulos angiogénicos migrando al sitio del tumor y contribuyendo a la vascularización del tumor así como a la curación de la herida in vivo. Este hallazgo confirma que las células endoteliales generadas a partir de CMAM poseen todas las características funcionales del endotelio maduro. El grado de contribución de las células endoteliales a la neoangiogénesis y angiogénesis tumoral fue de un 35-45%, niveles similares a lo que se ha descrito para otras fuentes de células endoteliales (Conway et al., 2001; Ribatti et al., 2001). Además, se ha descubierto que los estímulos angiogénicos in vivo proporcionados en un microambiente tumoral son suficientes para reclutar CMAM al lecho tumoral e inducir su diferenciación en células endoteliales que contribuyen al sistema vascular tumoral. Estos estudios por tanto amplían los estudios publicados por otros grupos que demuestran que las células presentes en la médula pueden contribuir a la formación de nuevos vasos sanguíneos (Peichev et al., 2000; Lin et al., 2000; Gehling et al., 2000; Asahara et al., 1997), en un proceso similar a la vasculogénesis y se ha identificado el precursor responsable de este proceso. Según el conocimiento de los autores, esta es la primera publicación que identifica una célula presente en la MO después del nacimiento en forma de un progenitor muy temprano de células endoteliales.

Ejemplo 10. Derivación de neuronas

Se evaluaron CMAMr o CMAMh derivadas de MO adultas únicas para determinar si eran capaces de diferenciarse ex vivo en neuronas funcionales, así como en astrocitos y oligodendrocitos aparte de tipos celulares mesodérmicos. Se seleccionaron y se expandieron en cultivo CMAMh y CMAMr tal como se ha descrito previamente en los Ejemplos 1 y 3 respectivamente. Se adquirieron células progenitoras neurales humanas (CPNh) de Clonetics (San Diego, CA). Se cultivaron y diferenciaron CPNh siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Electrofisiología: Se empleó un registro estándar de pinzamiento zonal de membrana de células enteras para examinar las propiedades fisiológicas de neuronas derivadas de CMAM. Se obtuvieron los registros del pinzamiento de voltaje y el pinzamiento de la corriente utilizando un amplificador de pinzamiento zonal de membrana Dagan 3900A (Dagan Corporation, Mineápolis) el cual se mejoró acoplándolo a una unidad de expansión Dagan 3911. Las pipetas para el pinzamiento, hechas de vidrio borosilicatado, se obtuvieron por estiramiento con un estirador de pipetas Narishige (modelo PP-83) y se pulieron utilizando una microforja Narishige (modelo MF-83). Las pipetas para el pinzamiento se rellenaron con una solución salina intracelular constituida por (en mM) KF 142,0, Na₂SO₄ 7,0, MgSO₄ 3,0, CaCl₂ 1,0, HEPES 5,0, EGTA 11,0, glutatión 1,0, glucosa 2,0, ATP 1,0 (sal magnésica) y GTP 0,5 (sal sódica). Para la mayoría de los registros, también se añadió el colorante fluorescente 5,6-carboxifluoresceína (0,5 mM; Eastman Kodak Chemicals) a la solución de la pipeta para confirmar visualmente, utilizando microscopía de fluorescencia, que se había conseguido la configuración del registro de la zona de la célula entera. Las resistencias de las pipetas estuvieron comprendidas entre 11 y 24 Mohm. La solución salina estándar de registro extracelular comprendió los siguientes componentes (en mM): NaCl 155, KCl 5,0, CaCl₂, MgCl₂ 1,0, HEPES 10 y glucosa 5. Para algunos experimentos se añadió TTX 1 μM a la solución de control estándar. Se ajustó el pH de las soluciones de registro intracelular y extracelular a 7,4 y 7,8 respectivamente, utilizando NaOH. Todos los reactivos químicos se adquirieron de Sigma. Se utilizó un PClamp 8.0 (Axon Instruments, Foster City) para llevar a cabo los experimentos y para adquirir y almacenar los datos. Se corrigieron los datos presentados en función de un potencial de unión de líquidos de 8.4 mV, el cual se calculó utilizando el paquete de software JPCALC. Se obtuvieron los análisis fuera de

línea y las representaciones gráficas de los datos utilizando un Clampfit 8.0 (Axon Instruments, Foster City) y Prism (Graphpad, San Diego).

- 5 Transducción: Se produjo el sobrenadante retroviral incubando células PG13 que contenían MGF-eGFP, proporcionadas por el Dr. G. Wagemaker, U. de Rotterdam, Países Bajos (Bierhuizen et al., 1997), en medio de expansión de CMAM durante 48 horas, se filtró y se congeló a -80 °C. Se incubaron las CMAM con sobrenadantes retrovirales y 8 µg/mL de protamina (Sigma) durante 6 h. Esto se repitió 24 horas más tarde. Se analizó por FACS la eficiencia de la transducción.
- 10 Análisis por micromatriz génica: Se aisló ARN a partir de células inducidas con FCF-8b + FCE, FCFb o CMAMh utilizando el minikit RNeasy (Qiagen), se digirió con desoxirribonucleasa I (Promega) a 37 °C durante 1 h y se purificó de nuevo utilizando el RNeasy. La sonda de ADNc marcada con [³²P] dATP, producida de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes, se hibridó con una matriz del atlas de neurobiología humana (Clontech #7736-1, Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, EE. UU.) a 68 °C durante 18-20 h, seguido de 4 lavados con 2x SSC, SDS al 1% a 68 °C durante 30 min cada uno, 0,1x SSC, SDS al 0.5% a 68 °C durante 30 min y una vez con 2x SSC a temperatura ambiente durante 5 min. Se leyeron las matrices mediante un dispositivo por imagen fosforescente con escáner de pantalla (Molecular Dynamics, Storm 860) y se analizó utilizando un Atlas Image 1.0 (Clontech). Se consideraron significativas las diferencias entre células diferenciadas e indiferenciadas mayores a un factor de 2.
- 15 Análisis por PCR del inserto retroviral: Se empleó PCR para amplificar la secuencia adyacente en dirección 3' de la LTR 3' del vector MGF en el ADN genómico humano. Se preparó ADN a partir de 10⁶ CMAM o de progenie diferenciada neuroectodérmica, endotelial o de mioblasto mediante métodos estándar. Se digirieron 300 ng de ADN genómico con Ascl y se unió un conector splinkerette al extremo 5' (Devon R. S. et al., 1995). Los dos oligonucleótidos utilizados para el conector splinkerette fueron los siguientes:
- 20 aattTAGCGGCCGCGITGAATlttttttgcaaaaa, (la secuencia que forma el bucle en horquilla está en minúsculas y la cadena complementaria inversa del segundo oligo splinkerette está en mayúsculas), y agtgtgagtcacagtagtctcgcgttc gAATTAAGCGGCCGCTA (la secuencia subrayada es también la secuencia del cebador específico del conector (Cebador LS) utilizado para los pasos de PCR y RT). Se utilizó un cebador conjugado con 5'-biotina-T7 que reconoce una secuencia en el gen eGFP [Biotina-ggc-cag-tga-att-gta-ata-cga-ctc-act-ata-ggc-tgg-CAC-ATG-GTC-
- 25 CTG-CTG-GAG-TTC-GTG-AC; la porción subrayada muestra la secuencia promotora mínima necesaria para una transcripción in vitro eficaz y la región específica del eGFP está en mayúsculas] y el cebador LS para amplificar las regiones adyacentes durante 10 ciclos utilizando la polimerasa Advantage 2 (Clontech). Se capturó el producto amplificado marcado con biotina utilizando microesferas magnéticas con estreptavidina (Streptavidin Magnetic Particles; Roche) y el producto resultante se amplificó adicionalmente en una proporción de aproximadamente 1000 utilizando la ARN-polimerasa T7 y a continuación se trató con ADNasa 1. El producto resultante se transcribió de manera inversa utilizando el cebador splinkerette agtgtgagtcacagtagtctcgcgttc de acuerdo con el protocolo Superscript II (Gibco) y a continuación se amplificó con 30 ciclos de PCR con cebadores internos utilizando el cebador para la LTR3' [ggc caa gaa cag atg gaa cag ctg aat atg]. Se secuenció la región adyacente en el genoma humano de células diferenciadas neuroectodérmicas, musculares y endoteliales y CMAM indiferenciadas.
- 30 Para demostrar que el mismo sitio de inserción estaba presente en múltiples progenies diferenciadas, se generaron cebadores específicos en el genoma adyacente del receptor. Se empleó amplificación por PCR en tiempo real (ABI PRISM 7700, Perkin Elmer/Applied Biosystems) para cuantificar la secuencia adyacente respecto a la secuencia eGFP. Las condiciones de reacción para la amplificación fueron las siguientes: 40 ciclos de una PCR de dos pasos (95 °C durante 15 s, 60 °C durante 60 s) tras la desnaturalización inicial (95 °C durante 10 min) con 2 µL de solución de ADN, tampón de reacción de PCR TaqMan SYBR GreenUniversal Mix 1X (Perkin Elmer/Applied Biosystems). Se utilizaron los siguientes cebadores: Clon A 16: cebador para la LTR = CCA-ATA-AAC-CCT-CTT-GCA-GTT-G; Secuencia adyacente del cromosoma 7 = TCC-TGC-CAC-CAG-AAA-TAA-CC; Clon A 12 secuencia del cromosoma 7: cebador para la LTR = GGA-GGG-TCT-CCT-CTG-AGT-GAT-T, Secuencia adyacente = CAG-TGG-CCA-GAT-CTC-ATC-TCA-C; Clon A12 secuencia del cromosoma 1: LTR = GGA-GGG-TCT-CCT-CTG-AGT-GAT-T; Secuencia adyacente = GCA-GAC-GAG-GTA-GGC-ACT-TG. Se calculó la cantidad relativa de la secuencia adyacente respecto a la secuencia eGFP de acuerdo con las recomendaciones del fabricante utilizando el 7700 ABI PRISM Detector Software 1.6.
- 35 Trasplante neural: En este estudio se utilizaron ratas macho Sprague Dawley recién nacidas (P1-P3) (Charles River Laboratories). Las ratas se anestesiaron por crioadestesia. Se inmovilizó el cráneo utilizando un soporte para la cabeza estereotáctico modificado y se retiró el cuero cabelludo para dejar el cráneo al descubierto. Se recolectaron las CMAMh con tripsina al 0,25%/EDTA, se lavaron dos veces y se resuspendieron en PBS. La viabilidad de las CMAMh fue superior al 85%. Se llevó a cabo una inyección intracerebroventricular de manera estereotáctica de un volumen de 2 µL de CMAMh suspendidas en solución salina tamponada con fosfatos con una concentración de 0,7x10⁴ células/µL mediante una micropipeta de vidrio reducida unida a una jeringa Hamilton utilizando las siguientes coordenadas (mm desde el punto bregma): AP -0,6, ML 0,8, DV 2,1, la barra dentada se fijó a -1. Tras las inyecciones, se suturó el cuero cabelludo y se permitió que las crías se recuperaran.
- 40 Cuatro y 12 semanas tras el trasplante, se anestesiaron las ratas con hidrato de cloral (350 mg/kg, i.p.), se decapitaron, se extrajeron los cerebros, se congelaron en hielo seco pulverizado y se almacenaron a -80 °C. Se

5 obtuvieron cortes de cerebros congelados en fresco utilizando un criostato y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 min inmediatamente antes de la tinción. Se incubaron los cortes durante una hora a temperatura ambiente con una solución de bloqueo/permeabilización constituida por suero de mono normal al 2% (Jackson Immuno Labs) y tritón X al 3%. Se diluyeron los anticuerpos primarios y secundarios en la misma solución de bloqueo/permeabilización para los pasos posteriores. Los anticuerpos primarios (de ratón anti-núcleo humano (1:25), anti-membrana nuclear humana (1:25) y anti-NeuN (1:200) de Chemicon; de conejo anti-GFAP (1:250) de DAKO, de conejo anti-NF200 (1:300) de Sigma se incubaron toda la noche a 4 °C, se lavaron 3x10 minutos cada vez con PBS y a continuación se añadieron anticuerpos secundarios FITC (1:100) y anti Cy3 (1:200) (todos de Jackson Immuno Labs) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se examinaron los cortes por microscopía de fluorescencia utilizando una mira Zeiss Axiovert así como por microscopía de fluorescencia confocal utilizando un microscopio Confocal 1024.

Las CMAMh adquieren fenotipo de oligodendrocito, astrocito y neurona cuando se cultivan con FCFb

15 Se llevó a cabo la diferenciación neuroectodérmica tal como se ha descrito en el Ejemplo 5. Resumiendo, se cultivaron las células en portaobjetos con pocillos recubiertos con FN o placas de cultivo con medio exento de suero constituido por un 60% de DMEM-LG, 40% de MCDB-201 (Sigma Chemical Co, San Luis, MO), suplementado con ITS 1X, LA-BSA 1X, dexametasona 10^{-8} M, 2-fosfato del ácido ascórbico (AA) 10^{-4} M (todos de Sigma), 100 U de penicilina y 1000 U de estreptomycin (Gibco). En algunos cultivos se añadieron 100 ng/mL de FCFb mientras que en otros cultivos se añadieron 10 ng/mL de FCE + 10 ng/mL FCF-8b (todos de R&D Systems). Las células no se subcultivaron, sino que se renovó el medio cada 3-5 días.

25 Dos semanas después de volverlas a colocar en placas con FCFb, un $26 \pm 4\%$ de las células expresaron marcadores de astrocitos (GFAP+), $28 \pm 3\%$ de oligodendrocitos (MBP+) y $46 \pm 5\%$ de neuronas (NF200+), tal como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Marcadores de diferenciación de CMMh inducidas con FCFb y FCF-8b

	FCFb (7.º día)	FCFb (14.º día)	FCFb (21.º ^{er} día)	FCF-8b (7.º día)	FCF-8b (14.º día)	FCF-8b (21.º ^{er} día)
GFAP	36±4%	26±4%	0	0	0	0
MBP	35±3%	28±3%	4±2%	0	0	0
GalC	30+x%	26±5%	8±3%	0	0	0
Nestina	35±6%	6±3%	No ensayado	90±10%	10±6%	No ensayado
Neuro-D	20±2%	0%	No ensayado	50±6%	No ensayado	No ensayado
Tuji	30±3%	23±5%	23±2%	88±5%	92±3%	98±2%
PSA-NCAM	33±2%	16±3%	No ensayado	40±7%	No ensayado	No ensayado
NF68	0	26±7%	22±3%	0	20±3%	No ensayado
NF160	0	46±5%	50±3%	0	65±3%	No ensayado
NF200	0	15±2%	22±5%	0	75±8%	92±6%
NSE	0	40±4%	82±5%	0	78±3%	80±8%
MAP2-AB	0	40±6%	80±2%	0	95±4%	95±3%
Tau	0	28±2%	78±7%	0	93±2%	92±4%
GABA	0	0	0	0	39±4%	40±2%
Parvalbúmina	0	0	0	0	28±6%	35±3%
TH	0	0	0	20±5%	23±5%	25±6%
DCC	0	0	0	0	25±6%	28±2%
DTP	0	0	0	0	35±7%	38±3%
TrH	0	0	0	0	26±6%	25±4%
Serotonina	0	0	0	0	30±5%	35±3%
Nurr1	0	0	0	0	20±4%	23±2%
c-ret	0	0	0	0	33±3%	35±5%

5 Cuando se colocaron en placas de nuevo CMAMh con densidades celulares mayores (2×10^4 células/cm²) para inducir la diferenciación, no pudo detectarse ninguna célula con fenotipo neuroectodérmico, lo que sugiere que las interacciones célula-célula impiden la diferenciación neuroectodérmica inducida por FCFb.

10 La distribución de células similares a neuronas, oligodendrocitos y astrocitos no varió cuando se indujo la diferenciación con CMAMh que habían experimentado 20 o 60 DP. Sin embargo, cuando se cultivaron CMAMh expandidas durante más de 20 DP con FCFb, >50% de las células murieron mientras que >70% de las CMAMh expandidas en cultivo durante >30 DP sobrevivieron y adquirieron un fenotipo similar al de los oligodendrocitos, astrocitos o neuronas. Esto sugiere que no se puede inducir la adquisición de características neurales en todas las CMAMh, pero es posible que la subpoblación de CMAMh que sobrevive a largo plazo in vitro sea la responsable de la diferenciación neuronal. Se ha demostrado que el cariotipo de las CMAMh es normal independientemente de la duración del cultivo (Reyes et al., 2001). La diferenciación de CMAMh en células similares a las neuroectodérmicas, por tanto, no es probable que se deba a la transformación de CMAM tras un cultivo a largo plazo.

15 La mayoría de las células similares a oligodendrocitos y astrocitos murieron tras 3 semanas. Se observó la maduración progresiva de células similares a las neuronas a través de todo el cultivo. Después de 1 semana, las CMAMh tratadas con FCFb presentaron una tinción positiva para NeuroD, Nestina, la molécula de adhesión celular neural polisialilada (PSA-NCAM, por sus siglas en inglés) y tubulina- β -III (TuJ1) (Tabla 6). Después de 2 semanas, las células tratadas con FCFb presentaron una tinción positiva para NF68, -160 y -200, NSE, MAP2-AB y Tau. Las neuronas inducidas con FCFb no expresaron marcadores de neuronas dopaminérgicas, serotoninérgicas o GABAérgicas, pero expresaron glutamato así como los receptores 5, 6 y 7 de glutamato, el receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) y canales de voltaje dependientes de Na⁺.

20 Se obtuvo una confirmación adicional de la diferenciación neuroectodérmica a partir del análisis en matriz de ADNc de dos poblaciones de CMAMh independientes inducidas a diferenciarse durante 14 días con 100 ng/mL de FCFb. Niveles de expresión de nestina, otx I y otx1. De manera coherente con la caracterización inmunohistoquímica, se detectó un aumento en una proporción >2 en el ARNm de nestina, GFAP, receptores 4, 5 y 6 de glutamato, y glutamato y varios canales de voltaje dependientes de sodio, pero no se detectaron aumentos en los niveles de ARNm de TH o TrH. También se observó un aumento en una proporción >2 en los niveles de ARNm del ARNm del homólogo 1 achaete-scute de mamíferos (MASH 1, por sus siglas en inglés), un factor de transcripción encontrado únicamente en el cerebro (Franco Del Amo et al., 1993) y en el ARNm de efrina-A5 (O'Leary y Wilkinson, 1999). El ARNm de un precursor proteico priónico de gran importancia, de los marcadores específicos de astrocitos GFAP y S100A5, y de los marcadores específicos de oligodendrocitos, el precursor de la glucoproteína de la mielina de los oligodendrocitos y la proteína cero de la mielina (PMZ, por sus siglas en inglés), así como la Huntingtina se expresaron en una cantidad mayor en una proporción >2 tras la exposición a FCFb. También se observó un aumento superior a una proporción de 2 para varios receptores de glicina, receptores de GABA, el receptor A del hidroxitriptófano y el receptor de la acetilcolina neuronal, proteínas del transportador de glicina, sinaptobrevina y proteína asociada al sinaptosoma (SNAP)25. Finalmente, la expresión de FNDC inducida por FCFb y el factor neurotrófico derivado de la neuroglia (FNDN).

Al igual que las CMAMh, las CMAMr adquieren fenotipo de oligodendrocito, astrocito y neurona cuando se cultivan con FCFb

45 Se evaluaron CMAM derivadas de otras especies para determinar si se podían obtener resultados similares. Se colocaron en placas de nuevo CMAMr expandidas durante 40-90 DP con una concentración de 10^4 células/cm² en condiciones idénticas a las empleadas para las CMAMh. Después de 14 días las CMAMr adquirieron características morfológicas y fenotípicas de astrocitos (GFAP⁺), oligodendrocitos (MBP⁺) y neuronas (NF-200⁺, NSE⁺ y Tau). En ningún momento se detectaron NF200 y GFAP o MBP en la misma célula. Al contrario que las CMAMr indiferenciadas, las CMAMr tratadas con FCFb fueron significativamente mayores y extendieron los procesos durante >40 μ m.

50 Para determinar si las células similares a las neuronas presentaban características funcionales de neuronas, y si las células inducidas por FCFb mostraban evidencia de corrientes de Na⁺ dependientes de voltaje se empleó la técnica del pinzamiento zonal de membrana. No se observaron corrientes de sodio ni un comportamiento de espiga rápida en ninguna de las células similares a neuronas derivadas de CMAMr (n=59), aunque algunas células expresaron corrientes de calcio y se apreció evidencia de un comportamiento de espiga mediado por corrientes de calcio en 4 células. Por tanto, las células inducidas por FCFb no poseen corrientes de Na⁺ dependientes de voltaje funcionales, a pesar de la expresión del ARNm y proteína del canal de voltaje dependiente de sodio.

60 Las CMAMh adquieren un fenotipo GABAérgico, serotoninérgico y dopaminérgico mesencefálico cuando se cultivan con FCE y FCF-8b.

65 El FCF-8b, expresado en la frontera del rombencéfalo medio y por el presencéfalo rostral, induce la diferenciación de neuronas dopaminérgicas en el mesencéfalo y presencéfalo y de neuronas serotoninérgicas en el rombencéfalo (Ye et

al., 1998). El FCF-8b se ha utilizado in vitro para inducir neuronas serotoninérgicas y dopaminérgicas a partir de células ME murinas (Lee et al., 2000).

Las CMAMh (n=8), expandidas durante 20-60 DP, se colocaron de nuevo en placas con una concentración de 2×10^4 células/cm² en FN en medio exento de suero con ITS y AA y con 10 ng/mL de FCF-8b y 1 ng/mL de FCE. Más de un 80% de las células sobrevivieron durante 3 semanas. FCF-8b y FCE indujeron diferenciación en células que presentaron una tinción positiva para marcadores neuronales (Tabla 6) (7.º día: PSA-NCAM, nestina y TuJ1; 14.º: NF-68, NF-160, NF-200; y 21.º día: MAP2-AB, NSE, Tau y canales de voltaje dependientes de Na⁺) pero no en oligodendrocitos ni astrocitos. A diferencia de la observación por parte de los autores de la diferenciación inducida por FCFb, las células colocadas en placas con una concentración de 10^4 células/cm² con FCE y FCF-8b no experimentaron diferenciación. Después de 2-3 semanas, las células presentaron características de neuronas serotoninérgicas (TrH⁺ y serotonina⁺), dopaminérgicas (TH⁺, DCC⁺ y DTP⁺) y GABAérgicas (GABA⁺, parvalbúmina⁺) (Tabla 6). Las células también expresaron el receptor GABA-A y receptores de glutamato. Las células con un fenotipo dopaminérgico también presentaron una tinción positiva con Abs contra el factor de transcripción nuclear, Nurrl, expresado únicamente en las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (Saucedo-Cardenas et al., 1998) así como el protooncogén cRet, un receptor asociado a la membrana que es una proteína tirosina-cinasa, el cual es un componente del complejo receptor del factor neurotrófico derivado de la línea celular neuroglial (FNDN) expresado en las neuronas dopaminérgicas (Trupp et al., 1996). Esto sugiere que FCF-8b induce un fenotipo congruente con las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas.

De nuevo, se confirmaron los resultados de los estudios inmunohistoquímicos mediante análisis con una matriz de ADNc en CMAMh inducidas a diferenciarse durante 14 días con FCF-8b+FCE. De manera consistente con la caracterización inmunohistoquímica, se detectó un aumento en una proporción >2 en el ARNm de TH, TrH, glutamato, varios receptores de glutamato y canales de voltaje dependientes de sodio. Ya que la parvalbúmina y el GABA no estaban presentes en la matriz, su expresión no pudo confirmarse mediante el análisis del ARNm. De manera consistente con la diferenciación neural prácticamente exclusiva observada por inmunohistoquímica, no hubo un aumento en la expresión del ARNm de S100A5, GFAP ni en el ARNm del marcador específico de oligodendrocitos, PMZ. Las células inducidas con FCF-8b+FCE expresaron varias proteínas sinápticas, varios receptores de glicina, GABA e hidroxitriptamina, FNDN y FNDC y el receptor tirosina-cinasa (Trk)A en una proporción >2.

El cultivo conjunto con la línea celular de glioblastoma U87 estimula la maduración neuronal.

Independientemente de las condiciones de cultivo empleadas, las neuronas derivadas de CMAMh no sobrevivieron más de 3-4 semanas en cultivo. Ya que ninguno de los cultivos contuvieron células neurogliales después de 3 semanas, es posible que las células neuronales que expresan tanto glutamato como los receptores de glutamato murieran debido a la toxicidad del glutamato (Anderson y Swanson, 2000). De manera alternativa, los factores requeridos para la supervivencia, diferenciación y maduración de las células neurales proporcionados por las células neurogliales puede que no estuvieran presentes en los cultivos (Blondel et al., 2000; Daadi y Weiss, 1999; Wagner et al., 1999). Para comprobar esta hipótesis, se cultivaron células obtenidas de cultivos de 3 semanas con FCF-8b+FCE junto con la línea celular de glioblastoma U87 en medio exento de suero suplementado con FCF-8b+FCE durante 2 semanas más.

Se mantuvo la línea celular de glioma U-87 [American Tissue Cell Collection (Rockville, MD)] en DMEM+FCS al 10% (Hyclone Laboratories, Logan, UT). Las células obtenidas de cultivos de 3 semanas que contenían FCF-8b+FCE se marcaron con el colorante lipofílico PKH26 (Sigma) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se colocaron de nuevo las células marcadas en portaobjetos con pocillos recubiertos con FN en medio exento de suero que contenía FCF-8b+FCE junto con 1000 células U-87 y se mantuvieron durante 2-3 semanas más renovando el medio cada 3-5 días. Para garantizar que el PKH26 presente en las células derivadas de CMAM no se transfería a la línea celular U-87, se cultivaron las células U-87 en medio que contenía BSA y 20 µL del colorante PKH26 durante 7 días. No se detectaron células de glioma marcadas.

En estas condiciones exentas de suero, las células U-87 cesaron de proliferar pero sobrevivieron. Las neuronas derivadas de CMAMh se marcaron con el colorante de membrana, PKH26, antes del cultivo conjunto con células U-87 para permitir la identificación de células derivadas de CMAMh por microscopía de fluorescencia. Las neuronas inducidas con FCF-8b+FCE cultivadas conjuntamente después de 3 semanas con células U-87 y las mismas citocinas sobrevivieron al menos durante 2 semanas adicionales. Las neuronas adquirieron una morfología más madura con un mayor tamaño celular así como un mayor número, longitud y complejidad de las neuritas.

Se evaluaron las características electrofisiológicas de las células neurales marcadas con PKH26 derivadas de CMAMh tras el cultivo conjunto con células U-87 mediante un pinzamiento de corriente en células enteras y un pinzamiento de voltaje tras una inyección de corriente (Fig. 9B). El pinzamiento de corriente mostró un comportamiento en espigas en respuesta a la corriente inyectada en 4/8 de las células derivadas de CMAMh marcadas con PKH26 presentes en los cultivos FCF-8b+FCE/U-87. El potencial de membrana de reposo de células con espigas y sin espigas fue de $-64,9 \pm 5,5$ mV y $-29,7 \pm 12,4$ mV respectivamente. Para cada célula estudiada, la resistencia de entrada de las células con espigas y sin espigas fue de 194,3 (37.3) y 216,3 (52.5) Mohm

respectivamente. En la Fig. 9B se muestra un ejemplo de una de las células en las cuales se observó un comportamiento en espigas. El panel superior muestra una familia de trazas de voltaje la cual se obtuvo a partir de una célula con espigas en condiciones de control. En primer lugar se inyectó una corriente CC en la célula para mantenerla en el intervalo comprendido entre -100 y -120 mV. A continuación se utilizó un protocolo de inyección de corriente, tal como se muestra en el panel central, para conducir los potenciales de membrana a diferentes niveles. Tal como se muestra en este ejemplo, los pasos de corriente despolarizadora con una magnitud suficiente para llevar a las células al umbral del potencial de acción, provocaron una espiga única. El panel inferior muestra que el comportamiento en espigas de las células se puede bloquear mediante TTX 1 μ M, lo que sugiere que los potenciales de acción están mediados por canales de voltaje dependientes de Na. Los registros de corrientes a los que se les habían sustraído las fugas, obtenidos en modo de pinzamiento de voltaje a partir de las mismas células (Fig. 9C), mostraron una corriente hacia el interior que fue transitoria en la evolución temporal y activada con voltajes más positivos que -58 mV, así como corrientes hacia el exterior. La corriente transitoria hacia el interior se bloqueó de manera reversible con TTX 1 μ M. Esta farmacología, junto con la evolución temporal transitoria y la activación dependiente de voltaje de la corriente hacia el interior es típica de las corrientes de Na⁺ dependientes de voltaje, detectadas únicamente en las células del músculo esquelético y de neuronas maduras (Sah et al., 1997; Whitemore et al., 1999). No se detectaron marcadores de músculo esquelético en estas células similares a las neuronas. Estos estudios sugieren que el tratamiento con FCF-8b+FCE y el cultivo conjunto con células de glioblastoma dieron como resultado la maduración en células con las características fundamentales de las neuronas excitables, corrientes de Na⁺ dependientes de voltaje sensibles a TTX.

Las CMAMh trasplantadas en ventrículos de ratas recién nacidas se diferencian en células que expresan marcadores neuronales y de astrocitos

Se inyectaron $1,4 \times 10^4$ CMAMh estereotácticamente en los ventrículos laterales de ratas Sprague Dawley PI-P3. Después de 4 y 12 semanas, se sacrificaron los animales y se analizaron para detectar la presencia de células humanas y evidencia de diferenciación de CMAMh en neuroectodermo. Se pudieron apreciar células humanas, identificadas por tinción con anticuerpos contra núcleos humanos o membranas nucleares humanas en la ZSV hasta a 400 μ m de distancia del ventrículo en animales analizados después de 4 semanas, y después de 12 semanas, también se pudieron apreciar células humanas situadas más profundamente en el parénquima cerebral tal como en el hipocampo y a lo largo del trigono cerebral. Algunas células humanas presentaron una morfología típica de los astrocitos y una tinción positiva con anticuerpos anti-GFAP, mientras que otras células presentaron una tinción positiva con anticuerpos anti-Neu-N, NF-200 y anticuerpos anti-membranas nucleares humanas. La tinción triple mostró que células positivas para Neu-N y positivas para el antígeno nuclear humano no coexpresaban GFAP.

Resumen

El hallazgo principal de este trabajo es que se puede inducir la diferenciación de una CMAM única derivada de MO después del nacimiento no solo en tipos celulares mesodérmicos sino también en células con características neuronales maduras, así como con características de oligodendrocitos y astrocitos. Se ha demostrado la maduración dependiente del tiempo, así como la dependiente del método de cultivo, de CMAM en células con características neuroectodérmicas. La tinción doble demostró de manera concluyente que las células neurogliales o neuronales eran auténticas y que los resultados no se debían a marcadores neurogliales o neuronales expresados de manera inapropiada. Estos resultados se confirmaron al nivel del ARNm. Se emplearon estudios de marcaje retroviral para demostrar que las neuronas, astrocitos y oligodendrocitos se derivaban de una CMAM única que también se diferencia en músculo y endotelio, ya que la secuencia de la región genómica de la célula receptora adyacente al vector retroviral fue idéntica en todas las estirpes. Las CMAMh no solo adquirieron el fenotipo, sino también las características electrofisiológicas de las neuronas maduras, en concreto las corrientes de Na⁺ dependientes de voltaje y sensibles a TTX. Finalmente, también se ha demostrado que las CMAM se pueden diferenciar in vivo en células que expresan marcadores neuronales y de astrocitos.

Utilizando el marcaje retroviral de CMAMh combinado con la secuenciación basada en PCR de la secuencia genómica adyacente a la LTR 3' de inserto retroviral, se demostró que las neuronas se derivan de la misma CMAMh que se diferencia en astrocitos y oligodendrocitos, así como en endotelio y músculo (Jordan et al., 1990). Esto demuestra de manera concluyente que las CMAM pueden, en el nivel de célula única, diferenciarse en células de estirpes neuroectodérmicas y mesodérmicas. Se dio un nuevo nombre a las células con la capacidad de diferenciarse no solamente en tipos celulares mesodérmicos sino también en tipos celulares neuroectodérmicos, células madre adultas multipotentes o CMAM. Sanchez-Ramos et al. (Sanchez-Ramos et al., 2000) y Woodbury et al. (Woodbury et al., 2000) demostraron que las poblaciones de CMM de roedores o humanos pueden expresar marcadores de astrocitos y neuronas, pero no de oligodendrocitos in vitro. Sin embargo, ningún estudio proporcionó ninguna evidencia de que la misma célula que adquirió los marcadores neuroectodérmicos también pudiera diferenciarse en células mesodérmicas. Además, ningún estudio demostró que las células que expresaban marcadores neuronales también adquirieran características neuronales funcionales. Por tanto, aunque sugieren diferenciación neural, estos artículos no demuestran de manera concluyente la diferenciación neuroglial y neural a partir de CMM.

También se ha demostrado que las CMAMh trasplantadas en el ventrículo de ratas recién nacidas pueden migrar en la zona subventricular neurogénica y dentro del hipocampo donde responden a estímulos locales para diferenciarse en células que expresan marcadores neuronales y de astrocitos. Se escogió este modelo debido a que la migración y diferenciación de CMN en fenotipos neuronales específicos ocurre en una extensión mucho mayor cuando el trasplante se lleva a cabo en áreas germinales del cerebro que en áreas no neurogénicas, y cuando los trasplantes se llevan a cabo en animales recién nacidos en comparación con animales adultos (Bjorklund y Lindvall, 2000; Svendsen y Caldwell, 2000). Aunque las CMAMh son multipotentes y se diferencian en células fuera del neuroectodermo, las CMAMh no formaron teratomas. El número de células que habían migrado fuera de la zona subventricular después de 4 semanas fue bajo, pero se incrementó tras 12 semanas.

La facilidad con la que se pueden aislar CMAM de MO después del nacimiento, expandir e inducir su diferenciación in vitro en tipos celulares neuronales, de oligodendrocitos o astrocitos puede sortear uno de los problemas clave en el trasplante de CMN, en concreto la disponibilidad de un donante de tejido adecuado.

15 **Ejemplo 11. Diferenciación de CMAM en células similares a hepatocitos**

Durante la embriogénesis, la primera señal de morfogénesis hepática es el engrosamiento del epitelio endodérmico ventral, el cual ocurre entre las e7,5 y e8,5 en el ratón (Zaret K.S., 2001). Se sabe poco sobre las señales implicadas en la formación del endodermo inicial y la posterior especialización del endodermo. En la etapa temprana de la gastrulación (e6-e7) el endodermo no está especializado, ni tan siquiera en una dirección anterior/posterior (Melton D., 1997). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la exposición ex vivo del endodermo a FCF4 posterioriza el endodermo temprano, el cual se vuelve competente para expresar marcadores hepáticos (Wells J.M. et al., 1999). En la e8.5 en el ratón, el endodermo definitivo ha formado el tubo intestinal y expresa HNF3 β (Zaret K.S., 2000). Se induce el endodermo del intestino anterior hacia una estirpe hepatocítica mediante FCFb y FCFa (ácido), ambos producidos por el mesodermo cardíaco adyacente (Zaret K.S., 2001), los cuales son necesarios para inducir el destino hepático y no el destino pancreático predeterminado (Zaret K.S., 2001). También se requieren proteínas morfogenéticas básicas (PMB) producidas por la mesénquima transversal ya que aumentan los niveles del factor de transcripción GATA4 el cual promueve la capacidad del endodermo para responder a los FCF (Zaret K.S., 2001). Se requieren GATA4 y HNF3 β para la especialización hepática y son importantes efectores de eventos posteriores que dan lugar a la diferenciación hepatocítica, ya que aumentan de manera regulada los marcadores de la expresión específica hepatocítica tales como la albúmina, entre otros.

En la mayoría de los casos, los hepatocitos maduros pueden experimentar varias divisiones celulares y son responsables del reemplazamiento celular hepático. Como resultado, ha habido una gran controversia acerca de la existencia y función de una célula madre hepática. Durante la amplia necrosis hepática debida a una herida química o cuando se tratan los hepatocitos con compuestos químicos que bloquean su proliferación, una población de células más pequeñas con forma oval, denominadas células ovales, emergen y proliferan (Petersen, B.E., 2001). Estas células ovales pueden constituir la reserva de "células madre" en el hígado. Las células ovales residen en las unidades más pequeñas del árbol biliar, denominadas los canales de Herring, desde donde migran con dirección al parénquima hepático (Theise N.D. et al., 1999). Las células ovales son bipotenciales, dan lugar in vitro e in vivo tanto a los hepatocitos como al epitelio de la vía biliar. Las células ovales expresan varios marcadores hematopoyéticos tales como Thy1.1, CD34, receptor Flt-3 y c-Kit y también expresan α FP, CK19, γ -glutamyl-transferasa y OV-6. No se conoce el origen de las células ovales (Petersen, B.E., 2001; Kim T.H. et al., 1997; Petersen, B.E., 2001).

Hasta hace poco, se creía que los hepatocitos solo podían derivarse de células de origen endodérmico y de sus progenitores. Sin embargo, estudios recientes sugieren que las células no endodérmicas también pueden formar hepatocitos in vivo e in vitro (Petersen, B.E., 2001; Pittenger M.F. et al., 1999). Tras el trasplante de médula ósea (MO), las células ovales se derivan de la MO del donante (Theise N.D. et al., 1999). El trasplante de células madre hematopoyéticas (CMH) enriquecidas en ratones FAH^{-/-}, un modelo en animales de la tirosinemia de tipo I, dio como resultado la proliferación de un gran número de hepatocitos LacZ⁺ del donante y los animales presentaron una función bioquímica hepática restaurada (Lagasse E. et al., 2000). Además, las CMH únicas no solo repueblan el sistema hematopoyético sino que también contribuyen al epitelio del pulmón, de la piel, del hígado y del intestino (Krause D.S. et al., 2001). Las células tumorales pancreáticas exocrinas tratadas in vitro con dexametasona (Dex) con o sin oncostatina M (OSM) pueden adquirir un fenotipo hepatocítico (Shen C.N. et al., 2000). Finalmente, las células madre embrionarias (ME) de ratón adquieren espontáneamente un fenotipo hepatocítico, un proceso que se ve favorecido por el tratamiento con FCFa, FCH, OSM y Dex (Hamazaki T. et al., 2001).

Se ha demostrado que las CMAM únicas no solo se diferencian en células neuroectodérmicas y mesodérmicas, sino también en células con características funcionales, fenotípicas y morfológicas de los hepatocitos in vitro. Las CMAMr, CMAMrata y CMAMh adquieren un fenotipo similar al de los hepatocitos cuando se cultivan con FCF4 y/o FCH.

Se seleccionaron y cultivaron CMAMr, CMAMrata y CMAMh tal como se ha descrito. Para determinar las condiciones óptimas para la diferenciación de las CMAM en células similares a los hepatocitos, se evaluó el efecto de diferentes componentes de la matriz extracelular (MEC) y de citocinas de las cuales se sabe que inducen diferenciación en hepatocitos in vivo o a partir de células ME (Zaret K.S., 2001), en la diferenciación de CMAMr o

CMAMr en hepatocitos. Ya que la diferenciación requiere la interrupción del ciclo celular, también se evaluó el efecto de la densidad celular. Para demostrar la diferenciación en células similares a los hepatocitos, se tiñeron las células después de 14 días con Abs contra albúmina, CK18 y HNF3β.

5 Se observó la diferenciación óptima de CMAMr o CMAMr en células epitelioideas positivas para HNF3β, CK18 y albúmina cuando se colocaron las CMAM en placas con una concentración de 21,5x10³ células/cm² en presencia de 10 ng/mL de FCF4 y 20 ng/mL de FCH en Matrigel™ tal como se muestra en la Tabla 7A. Después de 14 días, el porcentaje de células epitelioideas positivas para HNF3β, CK18 y albúmina fue de un 61,4±4,7% y un 17,3% de las células fueron binucleadas. Cuando se colocaron en placas en FN, también se apreció diferenciación en células epitelioideas positivas para HNF3β y CK18, aunque tan solo un 53,1±6,3% de las células se tiñeron y se observó una cantidad aún menor de células binucleadas (10,9%).

15 El cultivo con FCF4 o FCH dio lugar a células epitelioideas positivas para HNF3β, CK18 y albúmina, pero el porcentaje de células positivas para HNF3β, CK18 y albúmina fue mayor cuando se trataron CMAMr o CMAMr tanto con FCF4 como con FCH, tal como se muestra en la Tabla 7A. La adición de FCFa, FCFb, FCF7, PMB u OSM no incrementaron el porcentaje de células positivas para los marcadores hepatocíticos, mientras que DMSO al 1% y butirato de sodio 0,1 mM-10 mM no promovieron la diferenciación de CMAMr o CMAMr en células positivas para los marcadores hepatocíticos.

20 Cuando se evaluaron densidades celulares comprendidas entre 2,5 y 25x10³ células/cm², se detectó el porcentaje más elevado de células con marcadores hepatocíticos en cultivos sembrados con 21.5x10³ células/cm². No se observó diferenciación en hepatocitos cuando las células se colocaron en placas con una concentración <12.5x10³ células/cm².

25 Se colocaron CMAMh en placas con una concentración de 3-30x10³ células/cm² en 10 ng/mL de FN o un 1% de Matrigel™ con FCFa, FCFb, FCF7, 1% de DMSO, FCH y/o FCF4. Únicamente las células tratadas solo con 10 ng/mL de FCF4, solo con 20 ng/mL de FCH o una combinación de ambos se diferenciaron en células epitelioideas que expresaban albúmina, CK18 y HNF3β. Las CMAMh que se colocaron en placas con una concentración de 15-30x10³ células/cm² se diferenciaron en células epitelioideas mientras que las CMAMh que se colocaron en placas con una concentración de 3x10³ células/cm² murieron. Al igual que las CMAMr o CMAMr, el porcentaje de células epitelioideas positivas para HNF3β, CK18 y albúmina fue mayor cuando las CMAMh se cultivaron en Matrigel™ (91,3% ± 4,4) que en FN (89,5% ± 5,4) y el porcentaje de células binucleadas fue mayor en Matrigel™ (31,3%) que en FN (28,7%) tal como se muestra en la Tabla 7B.

35 **Tabla 7: Optimización de la diferenciación de CMAM en células similares a los hepatocitos.**

	A: de Ratón y Rata			B: de Humanos		
	FCF-4	FCH	FCF4 +FCH	FCF-4	FCH	FCF-4+FCH
FN						
Albúmina	++/++	++/+	++/++	++++	++++	++++
CK18	++/++	++/+	++/++	++++	++++	++++
HNF3β	+++/>					
Matrigel™						
Albúmina	++/++	+/+	+++/>			
CK18	++/++	++/+	+++/>			
HNF3β	+++/>					
Colágeno						
Albúmina	-	-	-	NE	NE	NE
CK18	-	-	-	NE	NE	NE
HNF3β	-	-	-	NE	NE	NE
- = 0% + = 20%, ++ = 30%, +++ = 40%, ++++ = 60%, +++++ = 80% de las células presentaron una tinción positiva para marcadores específicos y NE = no evaluado.						

Caracterización fenotípica de la diferenciación de CMAM en células similares a los hepatocitos

40 Se evaluó adicionalmente la diferenciación en hepatocitos respecto al tiempo por microscopía confocal y de inmunofluorescencia para los marcadores tempranos (HNF3β, GATA4, CK19, αFP) y tardíos (CK18, albúmina,

HNF1 α) de la diferenciación en hepatocitos. Se colocaron en placas CMAMr o CMAMrata en Matrigel™ con FCF4 y FCH alargados desde un diámetro de 8 μ m hasta 15 μ m tal como se muestra en la Tabla 8A. En d21-d28, aproximadamente un 60% de las células fueron epitelioides y estuvieron rodeadas por células con forma de huso o redondeadas menores. Las CMAMr o CMAMrata indiferenciadas no expresaron ninguno de los marcadores citoplasmáticos o factores de transcripción hepáticos específicos. Después de 4 días, las células expresaron HNF3 β , GATA4 y α FP, niveles bajos de CK19 y muy pocas células presentaron una tinción positiva para HNF1 α , albúmina o CK18. A los siete días, las células epitelioides mayores presentaron una tinción positiva para HNF3 β , GATA4, HNF1 α con una tinción creciente para albúmina y CK18. Únicamente unas pocas células expresaron α FP. Después de 14, 21 y 28 días, las células epitelioides mayores presentaron una tinción positiva para GATA4, HNF3 β , HNF1 α , CK18 y albúmina, pero no para α FP o CK19. Las células menores que rodeaban los nódulos de células epitelioides presentaron una tinción positiva para CK19 y α FP.

Las CMAMh colocadas en placas en Matrigel™ con FCF4 y FCH o únicamente con FCF4 experimentaron un alargamiento desde 10-12 μ m hasta 20-30 μ m a día 21.^o. Después de 7 días, las células expresaron HNF3 β , GATA4 y niveles bajos de CK19, mientras que pocas células presentaron una tinción positiva para albúmina o CK18. Después de 14 y 21 días, >90% de las células epitelioides presentaron una tinción positiva para GATA4, HNF3 β , HNF1 α , HNF4, CK18 y albúmina, mientras que únicamente muy pocas células presentaron una tinción positiva para α FP o CK19 tal como se muestra en la Figura 10B.

Tabla 8: Patrón inmunohistoquímico de la expresión de marcadores de hepatocitos

	A: de Ratón y Rata					B: de Humanos				
	D4	D7	D10	D14	D21	D4	D7	D10	D14	D21
HNF3β		+/+	+/+	+/+		NE	+	NE	+	+
Gata4	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	NE	+	NE	+	+
α-FP	+/+	+/+	NE/NE	-/-	-/-	NE	+	NE	-	-
HNF1α	-/-	+/+	NE/NE	+/+	+/+	NE	-	NE	+	+
Albúmina	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	NE	+	NE	+	+
CK18	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	NE	-	NE	+	+

+ = se expresa el marcador, - = no se expresa el marcador y NE = no evaluado

Las células similares a los hepatocitos se derivan de la misma CMAMh única que se diferencia en neuroectodermo y endodermo

Se ha demostrado que una CMAMr o CMAMrata única se diferencia en endotelio, neuroectodermo y células endodérmicas positivas para albúmina y CK18. También se ha demostrado que una CMAMh única se diferencia en mesodermo y neuroectodermo. Se evaluó la misma CMAMh única para determinar si se podían diferenciar en células similares a los hepatocitos. Se obtuvieron, cultivaron y expandieron CMAM tal como se ha descrito. Para la diferenciación, se colocaron en placas CMAMr o CMAMrata con una concentración de 5-25x10³ células/cm² en 0,01-10 μ g/mL de fibropectina (FN), 0,01-8 μ g/mL de colágeno (Sigma Chemical Co., San Luis, MO) o 1% de Matrigel™ (Becton-Dickinson) en medio exento de suero [60% de DMEM bajo en glucosa (DMEM-LG; Gibco-BRL, Grand Island, NY), 40% de MCDB-201 (Sigma), suplementado con insulina/transferrina/selenio 1X, 4,7 μ g/mL de ácido linoleico, 1 mg/mL de albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés), dexametasona 10⁻⁸ M, 2-fosfato del ácido ascórbico 10⁻⁴ M (todos de Sigma), 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomycin (Gibco)], con 2% de FCS (Hyclone, Logan Utah) y 10 ng/mL de cada factor de crecimiento epidérmico (FCE) (Sigma), factor inhibidor de la leucemia (FIL; Chemicon, Temecula, CA) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP-BB; R&D Systems, Mineápolis, MN). Se colocaron en placas las CMAMh con una concentración de 15-30x10³ células/cm² en 0,1 μ g/mL de FN o 1% de Matrigel™ en el mismo medio sin FIL (Reyes M., 2002). Después de 8-12 h, se eliminó el medio, se lavaron las células dos veces con solución salina tamponada con fosfatos (PBS) (Fischer) y se cultivaron en medio exento de suero suplementado con 5-50 ng/mL de FCH, FCFa, FCFb, FCF4, FCF7 u OSM; o 10 mg/mL de sulfóxido de dimetilo (DMSO) o butirato de sodio 0,1-1 mM.

La transducción de CMAMh con eGFP se llevó a cabo utilizando un retrovirus que contenía un eGFP-ADNc y se expandió hasta >5x10⁶ células. Se indujo la diferenciación en músculo, endotelio, neuroectodermo y endodermo de un veinte por ciento. En el caso del clon A16, las CMAM indiferenciadas presentaron un único sitio de inserción retroviral al igual que las células diferenciadas neuroectodérmicas y mesodérmicas y las CMAM eGFP⁺ del clon A16 se diferenciaron en células positivas para albúmina y CK18. Las CMAM tratadas con FCF-4 generadas a partir de la misma población celular presentaron el mismo sitio de inserción (5'-TAG CGGCCGCTTGAATTGCAACGCGAGACTACTGTGACT CACACT-3', cromosoma 7) lo que prueba que una única CMAMh se diferencia en endodermo además de mesodermo y neuroectodermo.

La RT-PCR cuantitativa demuestra que FCF4 y FCH inducen la diferenciación y especialización en hepatocitos

5 Se confirmó por RT-PCR cuantitativa la diferenciación en hepatocitos en función de los marcadores tempranos (HNF3 β , GATA4, CK19, α FP) y tardíos (CK18, albúmina, HNF1 α , citocromo P450) de la diferenciación en hepatocitos. Se extrajo el ARN a partir de 3x10⁵ CMAM o CMAM inducidas a diferenciarse en hepatocitos. Se transcribió de manera inversa el ARNm y se amplificó el ADNc tal como sigue: 40 ciclos de una PCR de dos pasos (95 °C durante 15", 60 °C durante 60") después de la desnaturalización inicial (95 °C durante 10') con 2 μ L de una solución de ADN, tampón de reacción de PCR Taqman SYBR Green Universal Mix 1X utilizando un ABI PRISM 7700 (Perkin Elmer/Applied Biosystems). Los cebadores utilizados para la amplificación se enumeran en la Tabla 9.

10

Tabla 9: Cebadores utilizados

Nombre del cebador	Cebadores
RATÓN	
HNF1 α	S: 5'-TTCTAAGCTGAGCCAGCTGCAGACG-3' A: 5'-GCTGAGGTTCTCCGGCTCTTFCAGA-3'
HNF3 β	S: 5'-CCAACATAGGATCAGATG-3' A: 5'-ACTGGAGCAGCTACTACG-3'
GATA4	S: 5'-AGGCATTACATACAGGCTCACC-3' A: 5'-CrGTGGCCTCTATCACAAGATG-3'
CK18	S: 5'-TGGTACTCTCCTCAATCTGCTG-3' A: 5'-CTCTGGATTGACTGTGGAAGTG-3'
CK19	S: 5'-CATGGTTCTTCTTCAGGTAGGC-3' A: 5'-GCTGCAGATGACTTCAGAACC-3'
Albúmina	S: 5'-TCAACTGTCAGAGCAGAGAAGC-3' A: 5'-AGACTGCCTTGTGTGGAAGACT-3'
α FP	S: 5'-GTGAAACAGACTTCCTGGTCCT-3' A: 5'-GCCCTACAGACCATGAAACAAG-3'
TTR	S: 5'-TCTCTCAATTCTGGGGGTTG-3' A: 5'-TTTACAGCCAACGACTCTG-3'
Cyp2b9	S: 5'-GATGATGTTGGCTGTGATGC-3' A: 5'-CTGGCCACCATGAAAGAGTT-3'
Cyp2b13	S: 5'-CTGCATCAGTGTATGGCATITT-3' A: 5'-TTTGCTGGAAGTGAAGTACCA-3'
HUMANO	
α FP	S: 5'-TGCAGCCAAAGTGAAGAGGGAAGA-3' A: 5'-CATAGCGAGCAGCCCAAAGAAGAA-3'
Albúmina	S: 5'-TGC TTG AATGTGCTGATGACAGGG-3' A: 5'-AAGGCAAGTCAGCAGGCATCTCATC-3'
CK19	S: 5'-ATGGCCGAGCAGAACCGGAA-3' A: 5'-CCATGAGCCGCTGGTACTCC-3'
CK18	S: 5'-TGGTACTCTCCTCAATCTGCTG-3' A: 5'-CTCTGGATTGACTGTGGAAGT-3'
CYP1B1	S: 5'-GAGAACGTACCGGCCACTATCACT-3' A: 5'-GTTAGGCCACTTCAGTGGGTCATGAT-3'
CYP2B6	S: 5'-GATCACACCATATCCCCGGA-3'

Nombre del cebador	Cebadores
RATÓN	
	A: 5'-CACCCCTACCACCCATGACCG-3'
RATA	
HNF1 α	S: 5'-AGCTGCTCCTCCATCATCAGA-3'
	A: 5'-TGTTCCAAGCATTAAAGTTTTCTATTCTAA-3'
HNF3 β	S: 5'-CCTACTCGTACATCTCGCTCATCA-3'
	A: 5'-CGCTCAGCGTCAGCATCTT-3'
CK18	S: 5'-GCCCTGGACTCCAGCAACT-3'
	A: 5'-ACTTTGCCATCCACGACCTT-3'
CK19	S: 5'-ACCATGCAGAACCTGAACGAT-3'
	A: 5'-CACCTCCAGCTCGCCATTAG-3'
Albúmina	S: 5'-CTGGGAGTGTGCAGATATCAGAGT-3'
	A: 5'-GAGAAGGTCACCAAGTGCTGTAGT-3'
α FP	S: 5'-GTCCTTTCTCCTCCTGGAGAT-3'
	A: 5'-CTGTCACTGCTGATTTCTCTGG-3'
TTR	S: 5'-CAGCAGTGGTGCTGTAGGAGTA-3'
	A: 5'-GGGTAGAACTGGACACCAAATC-3'
Cyp2b1	S: 5'-GAGTTCTTCTCTGGTTCTCTG-3'
	A: 5'-ACTGTGGGTCATGGAGAGCTG-3'

5 Se normalizaron los niveles de ARNm utilizando actina β (de ratón o de humanos) o 18S (de rata) como genes constitutivos y se compararon con los niveles de ARNm en hepatocitos recién aislados de rata o de ratón, hepatocitos de rata cultivados durante 7 días o ARNm de ARN de hígado adulto humano adquirido de Clontech, Palo Alto, California.

10 En d0, las CMAMr y CMAMrata expresaron niveles bajos de ARNm de GATA4, albúmina, α FP, CK18, CK19, TTR, HNF3 β y HNF1 α pero no ARNm de CYP2B1 (rata) ni CYP2B9 y CYP2B13 (ratón) (Fig. 10). Tras el tratamiento de las CMAMr o CMAMrata con FCF4 y FCH, se incrementó la expresión del ARNm de GATA4 y HNF3 β en d2, se hizo máxima no más tarde de d4 y disminuyó ligeramente y se estabilizó no más tarde de d14. El ARNm de α FP y CK19 se incrementó después de d2, se hizo máximo no más tarde de d4 y disminuyó posteriormente. El ARNm de TTR se incrementó tras d4, se hizo máximo no más tarde de d7 y se estabilizó. El ARNm del enzima P450, CK18, albúmina y HNF1 α se incrementó después de d7 y se hizo máxima en d14. Entre d14 y d21, las CMAM inducidas con FCF4 y FCH expresaron ARNm de albúmina, TTR, CK18, CYP2B9 y CYP2B13 (ratón) y CYP2B1 (rata).

20 Las CMAMh indiferenciadas expresaron niveles bajos de ARNm de albúmina, CK18 y CK19, CYP1B1 pero no de α FP (Fig.10) ni CYP2B6. Los niveles de ARNm de albúmina, CK18, CK19, CYP1B1 se incrementaron significativamente en CMAMh cultivadas únicamente con FCF4 o con FCF4 y FCH durante 14 días en comparación con cultivos (de CMAM) del día 0. Los niveles de ARNm de albúmina, CK18 y CYP1B1 continuaron incrementándose y fueron mayores en d28. Aunque CYP1B1 no es un marcador de hepatocitos específico, su aumento regulado sugiere el compromiso con hepatocitos y su maduración. Se pudieron apreciar niveles bajos de CYP2B6, entre un 0.5% y un 1,0% del ARNm de hígado fresco en d14 y d21 pero no en d0. Los niveles de ARNm de marcadores de hepatocitos inmaduros (CK19 y α FP) disminuyeron según avanzaba la diferenciación y fueron mayores en cultivos inducidos únicamente con FCF4, mientras que los niveles de ARNm de hepatocitos maduros (CK18 y albúmina) fueron mayores en CMAM inducidas con FCF4 y FCH.

La inmunoelectrotransferencia demuestra que FCF4+FCH induce la diferenciación y especialización en hepatocitos

30 También se confirmó la expresión de genes específicos de los hepatocitos por inmunoelectrotransferencia y se llevó a cabo tal como lo describen Reyes et al. (2000). Los Abs contra α FP, albúmina humana y CK18 se diluyeron en una proporción 1:1000 en tampón de bloqueo. El anticuerpo de cabra anti-actina β (1:1000) provino de Santa Cruz. Los Abs secundarios fueron anticuerpos de cabra anti-ratón conjugados con HRP y de mono anti-cabra conjugados con

HRP (Amersham, Arlington Heights). Se llevó a cabo la ECL de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Amersham). Las CMAMh indiferenciadas no expresaron proteína α FP, albúmina o CK18 (Fig. 10B). Después de 35 días de tratamiento únicamente con FCF4 o con FCF4 y FCH, las CMAMh expresaron albúmina y CK18, pero no α FP, lo que es consistente con los análisis histoquímicos.

Las CMAMh, CMAMr y CMAMrata adquieren actividad funcional de hepatocitos

Se emplearon cinco ensayos diferentes para determinar si las células con características fenotípicas y morfológicas de hepatocitos también poseían atributos de hepatocitos funcionales.

Se cuantificó la producción y secreción de urea por parte de células similares a los hepatocitos en varios momentos de la diferenciación. Se determinaron las concentraciones de urea por medio de un ensayo colorimétrico (Sigma Cat. 640-1) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cultivaron hepatocitos de rata en una monocapa y se utilizaron brotes de hígado fetal de ratón como controles positivos y medio de cultivo como control negativo. El ensayo puede detectar concentraciones de urea de tan solo 10 mg/mL. Ya que el ensayo también cuantifica amoníaco, se evaluaron las muestras antes y después de la adición de ureasa.

No se detectó ni urea ni amoníaco en el medio de cultivo solo. Las CMAM indiferenciadas no produjeron urea. Tras el tratamiento con FCF4 y FCH, la producción de urea por parte de las CMAM se incrementó en una manera dependiente del tiempo. La evolución temporal de la producción de urea en cultivos de rata y ratón fue similar. En el caso de las CMAMh tratadas con FCF4 y FCH, no se detectó urea en d4, se observó que era similar a los cultivos de rata y ratón en d12 y excedió la de los cultivos de rata o ratón en d21. Los niveles de urea producidos por hepatocitos derivados de CMAM fueron similares a los de los cultivos en monocapa de hepatocitos de rata primarios. En las tres especies, se produjo una cantidad de urea significativamente mayor por parte de las células diferenciadas en Matrigel™ en comparación con FN.

Se cuantificó la producción de albúmina en varios momentos a lo largo de la diferenciación. Se determinaron las concentraciones de albúmina de rata mediante un ensayo de inmunoadsorción enzimática competitivo (ELISA) descrito previamente (Tzanakakis E.S. et al., 2001; Wells J.M. et al., 2000). Se determinaron las concentraciones de albúmina de ratón y humana utilizando un método similar al ELISA sustituyendo la albúmina de ratón o humana y los Abs anti-albúmina de ratón o humana por los componentes de rata según fuera necesario. La albúmina humana de referencia y la anti-albúmina humana conjugada con peroxidasa provinieron de Cappel. La albúmina de ratón de referencia y la anti-albúmina de ratón purificada por afinidad y conjugada con peroxidasa provinieron de Bethyl Laboratories (Montgomery, Texas). Para garantizar la especificidad del ELISA, los Abs de rata, ratón y humanos se incubaron durante 2 h a 37 °C con BSA al 3% en agua destilada (dH₂O). La sensibilidad del ELISA es de al menos 1 ng/mL.

Las CMAM indiferenciadas no secretaron albúmina. Tras el tratamiento con FCF4 y FCH, las CMAMh, CMAMr y CMAMrata produjeron albúmina de manera dependiente del tiempo. Como se había observado para la producción de urea, las CMAM diferenciadas en Matrigel™ produjeron cantidades mayores de albúmina que las cultivadas en FN. Las células humanas, de rata y ratón secretaron niveles similares de albúmina, a pesar de que no se detectó albúmina en los cultivos humanos en d3. Los niveles de albúmina producidos por hepatocitos derivados de CMAM de ratón, de rata y humanas fueron similares a aquellos observados en los cultivos en monocapa de hepatocitos de rata primarios.

A continuación se evaluó la actividad del citocromo P450 en agregados de hepatocitos derivados de CMAM y esferoides de hepatocitos hepáticos primarios de rata utilizando el ensayo PROD. Se formaron agregados de hepatocitos y CMAMr colocando en placas en d14 CMAM tratadas con FCF4 y FCH con una concentración de 5×10^4 células/cm², en placas de cultivo no tisular, las cuales se situaron en un agitador a 10 revoluciones por minuto durante 5 h. Se transfirieron los agregados celulares a placas Primaria™ y se permitió que se compactaran durante 4 días en presencia o ausencia de fenobarbital 1 mM. Los agregados de hepatocitos y CMAMh se formaron mediante el método de la gota colgante. Resumiendo, se colocaron 10^3 CMAMh tratadas durante 24 días con FCF4 y FCH en gotas de 100 μ L con o sin fenobarbital 1 mM. Tras 4 días, se recogieron los agregados y se evaluó la actividad del citocromo P450 mediante el ensayo PROD. El citocromo P450 O-desalquila la pentoxirresorufina (PROD) (Molecular Probes, Eugene, Oregón) y transforma un compuesto no fluorescente en un compuesto fluorescente, la resorufina (Tzanakakis E.S. et al., 2001). Por consiguiente, la intensidad de la fluorescencia causada por el metabolismo de PROD estima la actividad del citocromo P450 (CYP). Se llevó a cabo la evaluación y detección de la resorufina in situ utilizando microscopía confocal tal como está descrito (Tzanakakis E.S. et al., 2001).

No se apreció actividad PROD en los agregados de CMAMr o CMAMh indiferenciadas. Sin embargo, las CMAMr (18 días con FCF4 y FCH) y CMAMh (28 días, FCF4 solo) inducidas a formar agregados presentaron una actividad PROD significativa. La actividad PROD en agregados de hepatocitos derivados de CMAM fue similar a la de los agregados de hepatocitos primarios de rata. Varias células diferentes poseen actividad P450, pero el aumento regulado de la actividad de P450 por parte del fenobarbital solo se aprecia en los hepatocitos. Por tanto, también se evaluó P450 en presencia o ausencia de fenobarbital. Sin fenobarbital, varias enzimas P450 participan parcialmente

- en el metabolismo de PROD, lo que da lugar a un valor de fluorescencia mayor para esas muestras. Por el contrario, en los agregados inducidos por fenobarbital, la actividad de PROD es metabolizada prácticamente en su totalidad por los citocromos de ratón Cyp2b9, Cyp2b10 y Cyp2b13, el citocromo de rata Cyp2b1/2 (Tzanakakis E.S. et al., 2001) y por CYP2B6 en humanos. Por tanto, la actividad fluorescente aumentada es menor que el aumento real en la expresión proteica de dichos enzimas del citocromo P450. Cuando se cultivaron los agregados durante 96 horas con fenobarbital, se observó un aumento en la actividad PROD comprendida entre un 32% y un 39%, lo que sugiere la presencia de los Cyp2b13, Cyp2b10 y Cyp2b9 específicos de hepatocitos funcionales en CMAMr y de CYP2B6 en hepatocitos derivados de CMAMh.
- También se evaluó la capacidad de los hepatocitos derivados de CMAM de incorporar LDL incubando CMAMh tratadas con FCF4 con dil-acil-LDL. Las células se marcaron de manera conjunta con Abs anti-CK18 o anti-Pan-CK y HNF-3 β o GATA4. Después de 7 días, se detectó un nivel bajo de incorporación de a-LDL, el cual se incrementó hasta llegar a su punto máximo en d21.
- Otra función metabólica de los hepatocitos es la producción de glucógeno o la gluconeogénesis. Se analizaron los niveles de almacenamiento de glucógeno mediante la tinción con ácido peryódico de Schiff (PAS, por sus siglas en inglés) de CMAM de ratón inducidas con FCF4 y FCH y CMAMh inducidas con FCF en d3, d7, d14 y d21. Para llevar a cabo la PAS, se oxidaron las preparaciones con ácido peryódico al 1% durante 5' y se lavaron 3 veces con dH₂O. A continuación se trataron las preparaciones con el reactivo de Schiff durante 15', se lavaron con dH₂O durante 5-10', se tiñeron con hematoxilina de Mayer durante 1' y se lavaron con dH₂O. Se detectó almacenamiento de glucógeno por primera vez en d14 y se detectaron los niveles máximos tras d21 (Fig. 11).

Aislamiento y cultivo de hepatocitos

- Se recolectaron hepatocitos de ratas Sprague-Dawley macho de 4-6 semanas tal como está descrito (Seglen P.O., 1976). La viabilidad de los hepatocitos tras la recolección estuvo comprendida entre un 90-95%. Se cultivaron los hepatocitos tal como está descrito (Tzanakakis E.S. et al., 2001; Tzanakakis E.S. et al., 2001). Para formar una monocapa, se cultivaron los hepatocitos en placas con cultivo de Fisher 35 mM (Fischer Scientific, Pittsburgh, PA) recubiertas con 8 μ g/cm² de colágeno (Cohesion Technologies, Palo Alto, CA). Para formar esferoides, se cultivaron los hepatocitos en placas Primaria™ de 35 mm (Becton Dickinson). En ambas condiciones, la densidad de sembrado fue de 5x10⁴ células/cm². 12 h después de la colocación inicial en placas, se renovó el medio para eliminar células muertas y no adheridas. Posteriormente, se renovó el medio cada 48 horas.

Resumen

- Se ha demostrado que una única CMAM derivada de MO de ratón, rata o humano ya nacido se puede diferenciar in vitro en un tipo celular endodérmico con función y fenotipo de hepatocitos. Las CMAM, cultivadas en condiciones de diferenciación de hepatocitos, expresaron marcadores hepatocíticos primitivos y maduros en una manera dependiente del tiempo, tal como se observó mediante la microscopía de inmunofluorescencia de células marcadas de manera doble y triple. El perfil de expresión proteico fue específico de los hepatocitos y no espurio, ya que los marcadores no hepatocíticos no se expresan de manera conjunta con los antígenos hepatocíticos. Se confirmaron los resultados de la inmunohistoquímica mediante inmunoelectrotransferencia. Además, la RT-PCR corroboró el aumento regulado de los factores de transcripción HNF3 β y GATA4 de importancia conocida en la especialización en endodermo y los factores de transcripción requeridos para la diferenciación posterior en hepatocitos, tales como HNF3 β , y proteínas citoplasmáticas tales como CK19, CK18, α FP y albúmina.

- Aunque se ha demostrado que FCF4 solo o FCF4 y FCH inducen el paso de CMAM a células con características fenotípicas y morfológicas de los hepatocitos, esto solo no prueba que las células se hayan diferenciado en hepatocitos a menos que se pueda demostrar la adquisición de características funcionales de los hepatocitos. Por tanto, se llevaron a cabo varios pruebas funcionales en combinación para identificar hepatocitos funcionales. Las CMAMr, CMAMrata o CMAMh produjeron urea y albúmina, poseyeron una actividad del citocromo P450 inducible por fenobarbital, fueron capaces de incorporar dil-acil-LDL y contuvieron gránulos de glucógeno. Aunque la producción de urea es característica de la actividad de los hepatocitos, el epitelio tubular renal también produce urea (Hedlund E. et al., 2001). Por el contrario, la producción de albúmina es una prueba específica para la presencia y actividad metabólica de los hepatocitos (Hedlund E. et al., 2001). El citocromo P450, aunque se encuentra en los hepatocitos, también está presente en muchos otros tipos celulares (Jarukamjom K. et al., 1999). Sin embargo, se considera que la actividad de Cyp2b1 en ratas (Tzanakakis E.S. et al., 2001), Cyp2b9 y Cyp2b13 en ratones (Li-Masters T. et al., 2001; Zelko I. et al., 2000) y CYP2B6 en humanos es relativamente específica de los hepatocitos. La presencia de estas formas de P450 se demostró por RT-PCR. La especificidad respecto a los hepatocitos se intensifica aún más cuando la actividad de P450 es inducible por fenobarbital (Rader D.J. et al., 2000), tal como se demuestra. Aunque se aprecia incorporación de LDL en los hepatocitos (Oh S.H. et al., 2000), otras células tales como el endotelio poseen una capacidad similar (Avital I. et al., 2001). Finalmente, únicamente los hepatocitos pueden generar y almacenar glucógeno. Cuando se realizan juntos, estas pruebas funcionales demuestran que las CMAM de ratón, rata o humanos tratadas in vitro con FCF4 y FCH no solo expresan marcadores hepatocíticos sino que también poseen características funcionales consistentes con actividades metabólicas de los hepatocitos.

Varios estudios han demostrado que las células derivadas de MO se pueden diferenciar en células similares a los hepatocitos in vivo e in vitro (Petersen B.E. et al., 1999; Theise N.D. et al., 2000; Krause D.S. et al., 2001; Pittenger M.F. et al., 1999; Wang S. et al., 2001; Lagasse E. et al., 2000). Sin embargo, la mayoría de las investigaciones no han estudiado el fenotipo de la célula de MO que se diferencia en células con fenotipo de hepatocitos. Se desconoce si las células que presentan una tinción positiva para los marcadores hepatocíticos poseen características funcionales de hepatocitos y si las células que se diferencian en hepatocitos también se pueden diferenciar en células mesodérmicas, tales como las células hematopoyéticas. Lagasse et al. demostraron que las células cKit⁺Thy1^{bajo}Scal⁺Lin⁺ presentes en la MO murina se diferencian en células no solo con un fenotipo de hepatocitos sino también con función de hepatocitos (Lagasse E. et al., 2000). A pesar de que se pudieron observar resultados de este tipo con un trasplante de tan solo 50 células, este estudio no prueba que la misma célula que se diferencia en células hematopoyéticas también se diferencie en hepatocitos. Krause et al. demostraron que una única célula puede repoblar el sistema hematopoyético y dar lugar a escasos hepatocitos. Sin embargo, no se llevó a cabo una evaluación funcional de los hepatocitos (Krause D.S. et al., 2001). Avital et al. publicaron recientemente que las células Thy-1⁺, β₂m⁻ en MO de ratón expresan albúmina, proteína y ARNm de citocromo P450 3A2, C/EBPα y HNF4 (Wilmot I. et al., 1997), un fenotipo de progenitores de hepatocitos que se encuentra normalmente en el hígado. Por tanto, la presencia de células progenitoras de hepatocitos de este tipo en la MO podría explicar la diferenciación in vivo de la médula ósea en hepatocitos detectada en estudios recientes (Krause D.S. et al., 2001; Lagasse E. et al., 2000).

Para abordar la cuestión de si las células que dan lugar a células similares a hepatocitos funcionales también dan lugar a otros tipos celulares, se utilizó el marcaje retroviral (Reyes M. et al., 2001; Jiang Y., 2002). Se ha demostrado recientemente que las células que expresan albúmina, CK18 y HNF1α se pueden generar a partir de las mismas CMAMr y CMAMrata que se diferencian en células con un fenotipo neuroectodérmico y endotelial (Jiang Y., 2002). Se confirma que se han observado resultados similares para las CMAMh. En la presente se demuestra que la misma CMAMh única también se diferencia en células con fenotipo y morfología de hepatocitos, lo que amplía investigaciones publicadas recientemente que demuestran la derivación de células con función y fenotipo neuroectodérmicos y mesodérmicos a partir de una CMAMh única (Reyes M., 2002). Por tanto, se demuestra por primera vez que en la MO existen CMAM que no expresan marcadores hepatocíticos y no tienen una actividad de hepatocitos funcionales, las cuales dependiendo de las condiciones del cultivo, adquieren un fenotipo de hepatocitos y características funcionales de hepatocitos, o características funcionales y fenotípicas de células neuroectodérmicas y mesodérmicas.

Ejemplo 12. Trasplante de CMAM LacZ transgénicas para tratar ratones hemofílicos

Se derivaron CMAM a partir de ratones ROSA26 que contenían el transgén β-gal/NEO (10⁶ células/ratón) y se inyectaron i.v. en ratones hemofílicos (N=5) sin irradiación previa. Se sacrificaron los animales 1 (N=2) y 2 (N=3) meses después del trasplante de CMAM. Se tificaron muestras de médula ósea procesadas con una citospin y cortes congelados de hígado, bazo, músculo esquelético, corazón, pulmón e intestino para detectar la presencia del antígeno β-gal utilizando un anticuerpo anti-β-gal conjugado con FITC y pan-citoqueratina o CD45. También se analizaron los tejidos por Q-PCR para detectar el gen β-gal tal como se describe en el Ejemplo 6.

El análisis preliminar realizado por inmunohistoquímica y Q-PCR indica que uno de los tres animales (M3) analizados 2 meses después de la inyección presentaban un 0,1% de células epiteliales pulmonares derivadas de células del donante. La inmunohistoquímica también mostró que el animal M5 presentaba un injerto <1% de células CD45⁺ del donante en el bazo, médula e intestino. Los tejidos del animal M4 presentaron algunas células derivadas del donante por inmunohistoquímica; está pendiente la PCR de este animal.

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes se incorporan en la presente por referencia como si se hubieran incorporado de manera individual por referencia. Mientras que en la memoria descriptiva precedente se ha descrito esta invención en relación a ciertas realizaciones preferidas de la misma, y se han expuesto muchos detalles a efectos ilustrativos, será aparente para aquellos expertos en la técnica que la invención es susceptible de realizaciones adicionales y que algunos de los detalles descritos en la presente se pueden modificar considerablemente sin alejarse de los principios básicos de la invención.

REFERENCIAS

- Adams, R.H. y Klein, R. (2000). Eph receptors and ephrin ligands. Essential mediators of vascular development. *Trends Cardiovasc Med* 10:183-188.
- Alison, M. y Sarraf, C. (1998). Hepatic stem cells. *J Hepatol* 29: 678-83.
- Alizadeh, A.A., M.B. Eisen, R.E. Davis, C. Ma, I.S. Lossos, A. Rosenwald, J.C. Boldrick, H. Sabet, T. Tran, X. Yu, J.I. Powell, L. Yang, G.E. Marti, T. Moore, J.J. Hudson, L. LU. D.B. Lewis, R. Tibshirani, G. Sherlock, W:C. Chan, T.C. Greiner, D.D. Weisenburger, J.O. Armitage, R. Warnke y L.M. Staudt. 2000. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 403:503-511.
- Anderson, C. M. y Swanson, R. A. (2000). Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 31:1-14.
- Anderson, D. J., Gage, F. H. y Weissman, I. L. (2001). Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat Med.*, 393-5.

- Arsenijevic, Y. y Weiss, S. (1998). Insulin-like growth factor-I is a differentiation factor for postmitotic CNS stem cell-derived neuronal precursors: distinct actions from those of brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 18:118-28.
- Asahara, T., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka, C., Pastore, C., Silver, M., Keame, M., Magner, M. e Isner, J. M. (1999). Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85:221-8.
- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G. e Isner, J. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275, 964-967.
- Avital, I., Inderbitzin, D., Aoki, T., Tyan, D.B., Cohen, A.H., Ferrareso, C., Baumhueter, S., Dybdal, N., Kyle, C. e Lasky, L. (1994). Global vascular expression of murine CD34 a sialomucin-like endothelial ligand for L-selectin. *Blood* 84:2554.
- Ben-Shushan, E., Thompson, J. R., Gudas, L. J. y Bergman, Y. (1998). Rex- 1, a gene encoding a transcription factor expressed in the early embryo, is regulated via Oct-3/4 and Oct-6 binding to an octamer site and a novel protein, Rox-1, binding to an adjacent site. *Mol Cell Biol* 18:1866-78.
- Bierhuizen, M. F., Westerman, Y., Visser, T. P., Dimjati, W., Wognum, A. W. y Wagemaker, G. (1997). Enhanced green fluorescent protein as selectable marker of retroviral-mediated gene transfer in immature hematopoietic bone marrow cells. *Blood* 90:3304-15.
- Bjorklund, A. y Lindvall, O. (2000). Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat Neurosci* 3: 537-44.
- Bjornson, C., Rietze, B. Reynolds, M. Magli y A. Vescovi. (1999). Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science*. 283:354-357.
- Blondel, O., Collin, C., McCarran, W. J., Zhu, S., Zamostiano, R., Gozes, I., Brenneman, D. E. y McKay, R. D. (2000). A glia-derived signal regulating neuronal differentiation. *J Neurosci*. 20:8012-20.
- Bradley, A. (1987). Production and analysis of chimaeric mice. En: *Teratocarcinomas and ES Cells: A Practical Approach*. E.J. Robertson, ed. Oxford: IRL Press, 113-151.
- Brazelton, T. R., Rossi, F. M. V., Keshet, G. I. y Blau, H. E. (2000). From Marrow to Brain: Expression of Neuronal Phenotypes in Adult Mice. *Science* 290:1775-1779.
- Bruder, S., et al., Patente de los EE. UU. N.º 5.736.396
- Brustle, O., Jones, K., Learish, R., Karram, K., Choudhary, K., Wiestler, O., Duncan, I. y McKay, R. (1999). ES Cell-Derived Glial Precursors: A Source of Myelinating Transplants. *Science* 285:754-6.
- Brustle, O., Spiro, A. C., Karram, K., Choudhary, K., Okabe, S. y McKay, R. D. (1997). ES cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:14809-14814.
- Butler, D., (1999) FDA warns on primate xenotransplants. *Nature* 398:549.
- Caplan, A., et al., Patente de los EE. UU. N.º 5.486.359
- Caplan, A., et al., Patente de los EE. UU. N.º 5.811.094
- Caplan, A., et al., Patente de los EE. UU. N.º 5.837.539
- Cassiede P., Dennis, J. E., Ma, F., Caplan, A. I., (1996). Osteochondrogenic potential of marrow mesenchymal progenitor cells exposed to TGF-beta 1 or PDGF-BB as assayed in vivo and in vitro. *J Bone Miner Res*. 9:1264-73.
- Cereghini, S. (1996). Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *FASEB J*.10:267-82.
- Choi, K. (1998). Hemangioblast development and regulation. *Biochem Cell Biol*. 76:947-956.
- Choi, K., M. Kennedy, A. Kazarov, J.C. Papadimitriou y G. Keller. (1998). A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development*. 125:725-732.
- Ciccolini, F. y Svendsen, C. N. (1998). Fibroblast growth factor 2 (FGF-2) promotes acquisition of epidermal growth factor (EGF) responsiveness in mouse striata precursor cells: Identification of neural precursors responding to both EGF and FGF-2. *J Neuroscience* 18:7869-7880.
- Clarke, D. L., Johansson, C. B., Wilbertz, J., Veress, B., Nilsson, E., Karlstrom, H., Lendahl, U. y Frisen, J. (2000). Generalized potential of adult NSCs. *Science* 288:1660-3.
- Conway, E.M., Collen, D. y Carmeliet, P. (2001). Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res*. 49:507-521.
- Corbeil, D., Roper, K., Hellwig, A., Tavian, M., Miraglia, S., Watt, S.M., Simmons, P.J., Peault, B., Buck, D.W. y Huttner, W.B. (2000). The human AC 133 HSC antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *J Biol Chem*. 275:5512-5530.
- Crosby, H.A., Kelly, D.A. y Strain, A.J. 2001. Human hepatic stem-like cells isolated using c-kit or CD34 can differentiate into biliary epithelium. *Gastroenterology*. 120:534-544.
- Daadi, M. M. y Weiss, S. (1999). Generation of tyrosine hydroxylase-producing neurons from precursors of the embryonic and adult forebrain. *J Neurosci*.19:4484-97.
- Dahlstrand, J., Lardelli, M. y Lendahl, U. (1995). Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res*. 84:109-29.
- Devon R. S., Porteous D. J. y J., B. A. (1995). Splink-erettes improved vectorettes for greater efficiency in PCR walking. *Nucleic Acids Res* 23:1644-1645.
- DiGuisto, et al., Patente de los EE. UU. N.º 5.681.599
- Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M. y Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are NSCs in the adult mammalian brain. *Cell* 97:703-716.
- Eliceiri, B.P. y Cheresh, D.A. (2000). Role of alpha v integrins during angiogenesis. *Cancer J Sci Am*. 6, Supl. 13:S245-249.

- Evans, et al., (1992). *J. Am. Med. Assoc.*, 267:239-246.
- Faloon, P., Arentson, E., Kazarov, A., Deng, C. X., Porcher, C., Orkin, S. y Choi, K. (2000). Basic fibroblast growth factor positively regulates hematopoietic development. *Development*. 127:1931-1941.
- Fei, R., et al., Patente de los EE. UU. N.º 5.635.387
- 5 Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G. y Mavilio, F. (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279:528-30.
- Flax, J. D., Sanjay, A., Yang, C., Simonin, C., Wills, A. M., Billinghamurst, L. L., Jendoubi, M., Sidman, R. L., Wolfe, J. H., Kim, S. E. y Snyder, E. Y. (1998). Engraftable human NSCs respond to developmental cues replace neurons and express foreign genes. *Nature Biotech* 16:1033-1038.
- 10 Fong, G. H., Zhang, L., Bryce, D. M. y Peng, J. (1999). Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in *flt-1* knock-out mice. *Development*. 126:3015-3025.
- Franco Del Amo, F., Gendron-Maguire, M., Swiatek, P. J. y Gridley, T. (1993). Cloning, sequencing and expression of the mouse mammalian achaete-scute homolog a (*MASH1*). *Biochem Biophys Acta* 1171:323-7.
- Frankel, M. S. (2000). In *Search of Stem Cell Policy*. *Science* 298:1397.
- 15 Fridenshtein, A. (1982). Stromal bone marrow cells and the hematopoietic microenvironment. *Arkh Patol* 44:3-11.
- Furcht et al. *Solicitud Internacional N.º PCT/US00/21387*.
- Gage, F. H. (2000). Mammalian NSCs. *Science* 287:1433-1438.
- Gage, F., Coates, P., Palmer, T., Kuhn, H., Fisher, L., Suhonen, J., Peterson, D., Suhr, S. y Ray, J. (1995). Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:11879-83.
- 20 Gehling, U.M., Ergun, S., Schumacher, U., Wagener, C., Pantel, K., Otte, M., Schuch, G., Schafhausen, P., Mende, T., Kilic, N., Kluge, K., Schafer, B., Hossfeld, D.K. y Fiedler, W. (2000). In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood*. 95:3106-3112.
- Gritti, A., Frolichsthal-Schoeller, P., Galli, R., Parati, E. A., Cova, L., Pagano, S. F., Bjornson, C. R. y Vescovi, A. L. (1999). Epidermal and fibroblast growth factors behave as mitogenic regulators for a single multipotent stem cell-like population from the subventricular region of the adult mouse forebrain. *J Neurosci*. 19:3287-97.
- 25 Gronthos, S., Graves, S., Ohta, S. y Simmons, P. (1994). The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood* 84: 4164-73.
- Guenechea, G., Gan, O., Dorrell, C. y Dick, J. E. (2001). Distinct classes of human stem cells that differ in proliferative and self-renewal potential. *Nat Immunol* 2:75-82.
- 30 Gussoni, E., Soneoka, Y., Strickland, C., Buzney, E., Khan, M., Flint, A., Kunkel, L. y Mulligan, R. (1999). Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401:390-4.
- Hamazaki, T., Iiboshi, Y., Oka, M., Papst, P.J., Meacham, A.M., Zon, L.I. y Terada, N. 2001. Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro. *FEBS Lett* 497:15-19.
- 35 Haralabopoulos, G.C., D.S. Grant, H.K. Kleinman y M.E. Maragoudakis. (1997). Thrombin promotes endothelial cell alignment in Matrigel in vitro and angiogenesis in vivo. *Am J Physiol*. 273:C239-245.
- Hedlund, E., Gustafsson, J.A. y Warner, M. (2001). Cytochrome P450 in the brain; a review. *Curr Drug Metab* 2:245-263.
- Hill, B., Rozler, E., Travis, M., Chen, S., Zannettino, A., Simmons, P., Galy, A., Chen, B., Hoffman, R. (1996). High-level expression of a novel epitope of CD59 identifies a subset of CD34+ bone marrow cells highly enriched for pluripotent stem cells. *Exp Hematol*. 8:936-43.
- 40 Hirashima, M., H. Kataoka, S. Nishikawa, N. Matsuyoshi y S.Nishikawa. (1999). Maturation of ES cells into endothelial cells in an invitro model of vasculogenesis. *Blood* 93:1253-1263.
- Holash, J., Maisonpierre, P.C., Compton, D., Boland, P., Alexander, C.R., Zagzag, D., Yancopoulos, G.D. y Wiegand, S.J. (1999). Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science*. 284:994-998.
- 45 Hu, Z., Evarts, R. P., Fujio, K., Marsden, E. R. y Thorgeirsson, S. S. (1993). Expression of hepatocyte growth factor and c-met genes during hepatic differentiation and liver development in the rat. *Am J Pathol*. 142:1823-30.
- Iyer, V.R., Eisen, M.B., Ross, D.T., Schuler, G., Moore, T., Lee, J.C.F., Trent, J.M., Staudt, L.M., Hudson, J.J., Boguski, M.S., Lashkari, D., Shalon, D., Botstein, D. y Brown, P.O. (1999). The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science*. 283:83-87.
- 50 Jackson, K., Majka, S. M., Wang, H., Pocius, J., Hartley, C., Majesky, M. W., Entman, M. L., Michael, L., Hirschi, K. K. y M.A., G. (2001). Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 107:1395-1402.
- 55 Jackson, K., Mi, T. y Goodell, M. A. (1999). Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:14482-6.
- Jaiswal, N. et al., (1997). *J. Cell Biochem*. 64(2):295-312.
- Jarukamjorn, K., Sakuma, T., Miyaoura, J. y Nemoto, N. (1999). Different regulation of the expression of mouse hepatic cytochrome P450 2B enzymes by glucocorticoid and phenobarbital. *Arch Biochem Biophys* 369:89-99.
- 60 Jiang, Y. 2002. Enviado.
- Johansson, C. B., Momma, S., Clarke, D. L., Risling, M., Lendahl, U. y Frisen, J. (1999). Identification of a NSC in the adult mammalian central nervous system. *Cell*. 96:25-34.
- Johnstone, B., Hering, T. M., Caplan, A. I., Goldberg, V. M., Yoo, J. U. (1998). In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res*. 1:265-72.
- 65 Jordan, C. T. y Van Zant, G. (1998). Recent progress in identifying genes regulating HSC function and fate. *Curr Opin Cell Biol*. 10:716-20.

- Jordan, C., McKearn, J. y Lemischka, I. (1990). Cellular and developmental properties of fetal HSCs. *Cell* 61:953-963.
- Kim, T.H., Mars, W.M., Stolz, D.B., Petersen, B.E., y Michalopoulos, G.K. (1997). Extracellular matrix remodeling at the early stages of liver regeneration in the rat. *Hepatology* 26:896-904.
- 5 Kopen, G., D. Prockop y D. Phinney. 1999. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96:10711-10716.
- Kourembanas, S., Morita, T., Christou, H., Liu, Y., Koike, H., Brodsky, D., Arthur, V. y Mitsial, S.A. (1998). Hypoxic responses of vascular cells. *Chest*. 11 (Supl 1):25S-28S.
- 10 Krause, D. S., Theise, N. D., Collector, M. I., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R., Neutzel, S. y Sharkis, S. I. (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105:369-77.
- Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L., Wang, X., Finegold, M., Weissman, I.L. y Grompe, M. (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med*. 6:1229-1234.
- 15 Larsson, J., Goumans, M.J., Sjostrand, L.J., van Rooijen, M.A., Ward, D., Leveen, P., Xu, X., ten Dijke, P., Mummery, C.L. y Karlsson, S. (2001). Abnormal angiogenesis but intact hematopoietic potential in TGF-beta type I receptor-deficient mice. *EMBO J*. 20:1663-1673.
- Lazar, A., Peshwa, M. V., Wu, F. J., Chi, C. M., Cerra, F. B. y Hu, W. S. (1995). Formation of porcine hepatocyte spheroids for use in a bioartificial liver. *Cell Transplant* 4:259-68.
- 20 Lee, S. H., Lumelsky, N., Studer, L., Auerbach, J. M. y McKay, R. D. (2000). Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse ES cells. *Nat Biotechnol* 18:675-9.
- Lewis, I. D., Almeida-Porada, G., Du, J., Lemischka, I. R., Moore, K. A., Zanjani, E. D. y Verfaillie, C. M. (2001). Long-term repopulating cord blood stem cells are preserved after ex-vivo culture in a non-contact system. *Blood* 97:441-9.
- 25 Li, C.X. y Poznansky, M.J. (1990). Characterization of the ZO-1 protein in endothelial and other cell lines. *J Cell Sci*. 2:231-7. 97:231-237.
- Li-Masters, T. y Morgan, E.T. 2001. Effects of bacterial lipopolysaccharide on Phenobarbital-induced CYP2B expression in mice. *Drug Metab Dispos* 29:252-257.
- Lin, Y., Weisdorf, D. J., Solovey, A. y Hebbel, R. P. (2000). Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest*. 105:71-7.
- 30 Liu, S., Qu, Y., Stewart, T. J., Howard, M. J., Chakraborty, S., Holekamp, T. F. y McDonald, J. W. (2000). ES cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6126-31.
- Mahley, R.W. y Ji, Z.S. (1999). Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Lipid Res* 40:1-16.
- 35 Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 12:7634-8.
- Masinovsky, B., Patente de los EE. UU. N.º 5.837.670
- Mathon, N. F., Malcolm, D. S., Harrisingh, M. C., Cheng, L. y Lloyd, A. C. (2001). Lack of Replicative Senescence in Normal Rodent Glia. *Science* 291:872-875.
- 40 McGlave et al., Patente de los EE. UU. N.º 5.460.964
- Meager, A. (1999). Cytokine regulation of cellular adhesion molecule expression in inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev*. 10:27-39.
- Medvinsky, A. y Dzierzak, E. (1996). Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell*. 86:897.
- 45 Melton, D. (1997). Signals for tissue induction and organ formation in vertebrate embryos. *Harvey Lect* 93:49-64.
- Mezey, E., Chandross, K. J., Harta, G., Maki, R.A. y McKercher, S. R. (2000). Turning Blood into Brain: Cells Bearing Neuronal Antigens Generated in vivo from Bone Marrow. *Science* 290:1779-1782.
- Miyajima, A., Kinoshita, T., Tanaka, M., Kamiya, A., Mukouyama, Y., Hara, T. (2000). Role of Oncostatin M in hematopoiesis and liver development. *Cytokine Growth Factor Rev* 11:177-183.
- 50 Morrison, S. J., White, P. M., Zock, C. y Anderson, D. J. (1999). Prospective identification isolation by flow cytometry and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. *Cell*. 96:737-749.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastasiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H. y Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct 4. *Cell* 95:379-91.
- 55 Nishikawa, S., Nishikawa, S., Hirashima, M., Matsuyoshi, N. y Kodama, H. (1998). Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLKI+VEcadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development*. 125:1747-1757.
- Nishikawa, S.I., Nishikawa, S., Kawamoto, H., Yoshida, H., Kizumoto, M., Kataoka, H. y Katsura, Y. (1998). In vitro generation of lymphohematopoietic cells from endothelial cells purified from murine embryos. *Immunity*. 8:761-769.
- 60 Niwa, H., Miyazaki, J. y Smith, A. G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24:372-6.
- Nolta, J., Dao, M., Wells, S., Smogorzewska, E. y Kohn, D. (1996). Transduction of pluripotent human HSCs demonstrated by clonal analysis after engraftment in immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:2414-9.
- 65 Odorico, J. S., Kaufman, D. S. y Thomson, J. A. (2001). Multilineage differentiation from human ES cell lines. *Stem Cells* 19:193-204.

- Oh, S.H., Miyazaki, M., Kouchi, H., Inoue, Y., Sakaguchi, M., Tsuji, T., Shima, N., Higashio, K. y Namba, M. (2000). Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 279:500-504.
- 5 Okabe, S., Forsberg-Nilsson, K., Spiro, A. C., Segal, M. y McKay, R. D. (1996). Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from ES cells in vitro. *Mech Dev* 59:89-102.
- O'Leary, D. D. y Wilkinson, D. G. (1999). Eph receptors and ephrins in neural development. *Curr Opin Neurobiol* 9:65-73.
- Orkin, S. (1998). Embryonic stem cells and transgenic mice in the study of hematopoiesis. *Int. J. Dev. Biol.* 42:927-34.
- 10 Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S. M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M., Leri, A. y Anversa, P. (2001). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410:701-5.
- O'Shea, K. (1999). ES cell models of development. *Anat Rec* 15:32-41.
- Palmer, T. D., Markakis, E. A., Willhoite, A. R., Safar, F. y Gage, F. H. (1999). Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in NSCs from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci* 19:8487-97.
- 15 Palmer, T. D., Takahashi, J. y Gage, F. H. (1997). The adult rat hippocampus contains primordial NSCs. *Mol Cell Neurosci* 8:389-404.
- Partanen, J. y D.J. Dumont. (1999). Functions of Tie 1 and Tie2 receptor tyrosine kinases in vascular development. *Curr Top Microbiol Immunol.* 237:159-172.
- 20 Peault, B. 1996. Hematopoietic stem cell emergence in embryonic life: developmental hematology revisited. *J. Hematother.* 5:369.
- Peichev, M., Naiyer, A.J., Pereira, D., Zhu, Z., Lane, W.J., Williams, M., Oz, M.C., Hicklin, D.J., Witte, L., Moore, M.A. y Rafii, S. (2000). Expression of VEGFR 2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.* 95:952-958.
- Peshwa MV, WU FJ, Follstad BD, Cerra, F.B. y Hu, W.S. 1994. Kinetics of hepatocyte spheroid formation. *Biotechnology Progress* 10:460-466.
- 25 Petersen, B. E., Bowen, W. C., Patrene, K. D., Mars, W. M., Sullivan, A. K., Murase, N., Boggs, S. S., Greenberger, J. S. y Goff, J. P. (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284:1168-1170.
- Petersen, B.E. 2001. Hepatic "stem" cells: coming full circle. *Blood Cells Mol Dis* 27:590-600.
- Petersen, B.E., Bowen, W.C., Patrene, K.D., Mars, W.M., Sullivan, A.K., Murase, N., Boggs, S.S., Greenberger, J.S. y Goff, J.P. 1999. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284:1168-1170.
- 30 Petzelbauer, P., Halama, T. y Groger, M. (2000). Endothelial adherens junctions. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 5:10-13.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. y Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human MSCs. *Science* 284:143-147.
- 35 Pittenger, M., Patente de los EE. UU. N.º 5.827.740
- Ploemacher, R. E. y Brons, N. H. (1988). Isolation of hemopoietic stem cell subsets from murine bone marrow: I. Radioprotective ability of purified cell suspensions differing in the proportion of day-7 and day-12 CFU-S. *Exp Hematol* 16:21-6.
- Potten, C. (1998). Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353:821-30.
- 40 Prochazka, M., H.R. Gaskins, L.D. Shultz y E.H. Leiter. (1992). The nonobese diabetic scid mouse: model for spontaneous thymomagenesis associated with immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89:3290-3294.
- Rader, D.J. y Dugi, K.A. (2000). The endothelium and lipoproteins: insights from recent cell biology and animal studies. *Semin Thromb Hemost* 26:521-528.
- 45 Rafii, S., F. Shapiro, J. Rimarachin, R. Nachman, B. Ferris, B. Weksler, M. Moore y A. Asch. (1994). Isolation and characterization of human bone marrow microvascular endothelial cells: hematopoietic progenitor cell adhesion. *Blood.* 84:10-20.
- Rafii, S., Shapiro, F., Pettengell, R., Ferris, B., Nachman, R., Moore, M. y Asch, A. (1995). Human bone marrow microvascular endothelial cells support long-term proliferation and differentiation of myeloid and megakaryocytic progenitors. *Blood* 86:3353-61.
- 50 Reinhardt, R. L., Khoruts, A., Merica, R., Zell, T. y Jenkins, M. K. (2001). Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature* 401:101-105.
- Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Fong, C. Y., Trounson, A. y Bongso, A. (2000). ES cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotech* 18:399-404.
- 55 Reyes, M. y Verfaillie, C.M. (2001). Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 938:231-233; debate 233-235.
- Reyes, M., Lund, T., Lenvik, T., Aguiar, D., Koodie, L. y Verfaillie, C.M. (2001). Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 98:2615-2625.
- Reynolds, B. y Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255:1707-10.
- 60 Reynolds, B. y Weiss, S. (1996). Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol* 175:1-13
- Ribatti, D., A. Vacca, B. Nico, L. Roncali y F. Dammacco. (2001). Postnatal vasculogenesis. *Mech Dev.* 100:157-163.
- Richards, L. J., Kilpatrick, T. J. y Bartlett, P. F. (1992). De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89:8591-5.
- 65

- Rideout, W. M. 3.^o, Wakayama, T., Wutz, A., Eggan, K., Jackson-Grusby, L., Dausman, J., Yanagimachi, R., y Jaenisch, R. (2000). Generation of mice from wild-type and targeted ES cells by nuclear cloning. *Nat Genet* 24:109-10.
- 5 Robertson, S. M., Kennedy, M., Shannon, J. M., Keller, G. (2000). A transitional stage in the commitment of mesoderm to hematopoiesis requiring the transcription factor SCL/tal-1. *Development*. 11:2447-59.
- Rosenberg, J.B., P.A. Foster, R.J. Kaufman, E.A. Vokac, M. Moussalli, P.A. Kroner y R.R. Montgomery. (1998). Intracellular trafficking of factor VIII to von Willebrand factor storage granules. *J Clin Invest*. 101:613-624.
- Rozga, J., Arnaout, W.S. y Demetriou, A.A. (2001). Isolation, characterization, -derived hepatocyte stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 288:156-164.
- 10 Ryder, E. F., Snyder, E. Y. y Cepko, C. L. (1990). Establishment and characterization of multipotent neural cell lines using retrovirus vector-mediated oncogene transfer. *J Neurobiol* 21:356-375.
- Sah, D. W., Ray, J. y Gage, F. H. (1997). Regulation of voltage- and ligand-gated currents in rat hippocampal progenitor cells in vitro. *J Neurobiol* 32:95-110.
- 15 Sanchez-Ramos, J., Song, S., Cardozo-Pelaez, F., Hazzi, C., Stedeford, T., Willing, A., Freeman, T. B., Saporta, S., Janssen, W., Patel, N., Cooper, D. R. y Sanberg, P. R. (2000). Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol*. 164:247-56.
- Saucedo-Cardenas, O., Quintana-Hau, J. D., Le, W. D., Smidt, M. P., Cox, J. J., De Mayo, F., Burbach, J. P. y Conneely, O. M. (1998). Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 4013-8.
- 20 Scherf, U., D.T. Ross, M. Waltham, L.H. Smith, J.K. Lee, L. Tanabe, K.W. Kohn, W.C. Reinhold, T.G. Myers, D.T. Andrews, D.A. Scudiero, M.B. Eisen, E.A. Sausville, Y. Pommier, D. Botstein, P.O. Brown y J.N. Weinstein. (2000). A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat Biotech*. 24:236-244.
- Scholer, H. R., Hatzopoulos, A. K., Balling, R., Suzuki, N. y Gruss, P. (1989). A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor. *EMBO J* 8:2543-50.
- 25 Schuldiner, M., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., Melton, D. A. y Benvenisty, N. (2000). From the cover: effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human ES cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:11307-12.
- Schwartz, et al., Patente de los EE. UU. N.^o .759.793
- Seglen, P.O. (1976). Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 13:29-83.
- 30 Shambloott, M., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E., Littlefield, J., Donovan, P., Blumenthal, P., Huggins, G., Gearhart, J.: (1998) Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 95:13726-31.
- Shen, C.N., Slack, J.M. y Tosh, D. (2000). Molecular basis of transdifferentiation of pancreas to liver. *Nat Cell Biol*. 2:879-887.
- 35 Shi, Q., S. Rafii, M. Hong-De Wu, E.S. Wijelath, C. Yu, A. Ishida, Y. Fujita, S. Kothari, R. Mohle, L.R. Sauvage, M.A.S. Moore, R.F. Storb y W.P. Hammond. (1998). Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*. 92:362-367.
- Shih, C.C., Y. Weng, A. Mamelak, T. LeBon, M.C. Hu y S. Forman. (2001). Identification of a candidate human neurohematopoietic stem-cell population. *Blood* 98:2412-2422.
- 40 Simeone, A. (1998). *Otx1* and *Otx2* in the development and evolution of the mammalian brain. *EMBO* 17:6790-8.
- Simmons, P. et al., Patente de los EE. UU. N.^o 5.677.136
- Soule HD et al. (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*; 51(5):1409-16.
- 45 Southern, P. J., Blount, P. y Oldstone, M. B. (1984). Analysis of persistent virus infections by in situ hybridization to whole-mouse sections. *Nature* 312:555-8.
- Steeber, D.A. y T. Tedder, F. (2001). Adhesion molecule cascades direct lymphocyte recirculation and leukocyte migration during inflammation. *Immunol Res*. 22:299-317.
- Steinberg, D., Pittman, R.C. y Carew, T.E. (1985). Mechanisms involved in the uptake and degradation of low density lipoprotein by the artery wall in vivo. *Ann N Y Acad Sci*. 454:195-206.
- 50 Studer, L., Spenger, C., Seiler, R, Othberg, A., Lindvall, O. y Odin, P. (1996). Effects of brain-derived neurotrophic factor on neuronal structure of dopaminergic neurons in dissociated cultures of human fetal mesencephalon. *Exp Brain Res* 108:328-36.
- Suhonen, J., Peterson, D., Ray, J. y Gage, F. (1996). Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo. *Nature* 383:624-7.
- 55 Svendsen, C. N. y Caldwell, M. A. (2000). NSCs in the developing central nervous system: implications for cell therapy through transplantation. *Prog Brain Res*. 127:13-34.
- Svendsen, C. N., Caldwell, M. A., Ostenfeld, T. (1999). Human neural stem cells: Isolation, expansion and transplantation. *Brain Path* 9:499-513.
- Tang, D. G., Tokumoto, Y. M., Apperly, J. A., Lloyd, A. C. y Raff, M. C. (2001). Lack of replicative senescence in cultured rat oligodendrocyte precursor cells. *Science* 291:868-71.
- 60 Tedder, T., Steeber, D., Chen, A. y Engel, P. (1995). The selections: vascular adhesion molecules. *FASEB J*. 9:866.
- Theise, N. D., Badve, S., Saxena, R., Henegariu, O., Sell, S., Crawford, J. M. y Krause, D. S. (2000). Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 31:235-40.
- Theise, N.D., Saxena, R., Portmann, B.C., Thung, S.N., Yee, H., Chiriboga, L., Kumar, A. y Crawford, J.M. (1999). The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology* 30:1425-1433.
- 65

- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. y Jones, J. M. (1998). ES cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:114-7.
- Thomson, J., Kalisman J., Golos, J., Durning, M., Harris, C., Becker, R., Hearn, J. (1995) Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7844-8,
- 5 Trupp, M., Arenas, E., Fainzilber, M., Nilsson, A. S., Sieber, B. A., Grigoriou, M., Kilkenny, C., Salazar-Gruesso, E., Pachnis, V. y Arumae, U. (1996). Functional receptor for BDNF encoded by the c-ret proto-oncogene. *Nature* 381:785-9.
- Tsai, R.Y. y McKay, R.D. (2000). Cell contact regulates fate choice by cortical stem cells. *J. Neurosci.* 20:3725-35.
- Tsukamoto et al., Patente de los EE. UU. N.º 5.750.397
- 10 Tsukamoto et al., Patente de los EE. UU. N.º 5.716.827
- Tzanakakis, E.S., Hansen, L.K. y Hu, W.S. (2001). The role of actin filaments and microtubules in hepatocyte spheroid self-assembly. *Cell Motil Cytoskeleton* 48:175-189.
- Tzanakakis, E.S., Hsiao, C.C., Matsushita, T., Rimmel, R.P. y Hu, W.S. (2001). Probing enhanced cytochrome P450 2B1/2 activity in rat hepatocyte spheroids through confocal laser scanning microscopy. *Cell Transplant.* 10:329342
- 15 Uchida, N., Buck, D.W., He, D., Reitsma, M.J., Masek, M., Phan, T.V., Tsukamoto, A.S., Gage, F.H. y Weissman, I.L. (2000). Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:14720-14725.
- Van Rijen, H., van Kempen, M.J., Analbers, L.J., Rook, M.B., van Ginneken, A.C., Gros, D. y Jongsma, H.J. (1997). Gap junctions in human umbilical cord endothelial cells contain multiple connexins. *Am J Physiol.* 272:C117-130.
- Verfaillie, C., Miller, W., Boylan, K., McGlave, P. (1992). Selection of benign primitive hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia on the basis of HLA-DR antigen expression. *Blood.* 79:1003-1010.
- 20 Vescovi, A. L., Paraati, E. A., Gritti, A., Poulin, P., Ferrario, M., Wanke, E., Frolichsthal-Schoeller, P., Cova, L., Arcellana-Panlilio, M., Colombo, A. y Galli, R. (1999). Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human NSC lines by epigenetic stimulation. *Exp Neurol* 156:71-83.
- Vescovi, A., Reynolds, B., Fraser, D. y Weiss, S. (1993). bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells. *Neuron* 11: 951-66.
- Vischer, U.M., H. Barth y C.B. Wollheim. (2000). Regulated von Willebrand factor secretion is associated with agonist-specific patterns of cytoskeletal remodeling in cultured endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20:883-891.
- 30 Wagner, D.D., Olmsted, J.B. y Marder, V.J. (1982). Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *J. Cell Biol.* 95:355-360.
- Wagner, J., Akerud, P., Castro, D. S., Holm, P. C., Canals, J. M., Snyder, E. Y., Perlmann, T. y Arenas, E. (1999). Induction of a midbrain dopaminergic phenotype in Nurrl-overexpressing NSCs by type 1 astrocytes. *Nat Biotech* 17:653-9.
- 35 Wakitani, S., Saito, T. y Caplan, A. (1995). Myogenic cells derived from rat bone marrow MSCs exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 18:1417-26.
- Wang, X., Al-Dhalimy, M., Lagasse, E., Finegold, M. y Grompe, M. (2001). Liver repopulation and correction of metabolic liver disease by transplanted adult mouse pancreatic cells. *Am J Pathol* 158:571-579.
- Watt, F. (1997). Epidermal stem cells: markers patterning and the control of stem cell fate. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353: 831-6.
- 40 Watt, S., Gschmeissner, S. y Bates, P. (1995). PECAM-1: its expression and function as a cell adhesion molecule on hemopoietic and endothelial cells. *Leuk Lymph.* 17:229.
- Weiss, M. J., Orkin, S. H. (1995) GATA transcription factors: key regulators of hematopoiesis. *Exp Hematol.* 2:99-107.
- 45 Weissman, I. L. (2000). Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* 287:1442-6.
- Wells, J. M. y Melton, D. A. (2000). Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers. *Development.* 127:1563-72.
- Wells, J.M. y Melton, D.A. (1999). Vertebrate endoderm development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:393-410.
- 50 Whittemore, S. R., Morassutti, D. J., Walters, W. M., Liu, R. H. y Magnuson, D. S. (1999). Mitogen and substrate differentially affect the lineage restriction of adult rat subventricular zone neural precursor cell populations. *Exp Cell Res* 252:75-95.
- Williams, R. L., Hilton, D. J., Pease, S., Willson, T. A., Stewart, C. If, Gearing, D. P., Wagner, E. F., Metcalf, D., Nicola, N. A. y Gough, N. M. (1988). Myeloid leukemia inhibitory factor maintains the developmental potential of ES cells. *Nature* 336:684-7.
- 55 Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J. y Campbell, K. H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810-3.
- Woodbury, D., Schwarz, E. J., Prockop, D. J. y Black, I. B. (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 15:364-70.
- 60 Yamashita, J., Itoh, H., Hirashima, M., Ogawa, M., Nishikawa, S., Yurugi, T., Naito, M., Nakao, K. y Nishikawa, S. (2000). Fki-positive cells derived from ES cells serve as vascular progenitors. *Nature.* 408:92-96.
- Yang, J., Nagavarapu, U., Relloma, K., Sjaastad, M.D., Moss, W.C., Passaniti, A. y Herron, G.S. (2001). Telomerized human microvasculature is functional in vivo. *Nat Biotechnol.* 19:219-224.
- 65 Ye, W., Shimamura, K., Rubenstein, J., Hynes, M. y Rosenthal, A. (1998). FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell* 93:755-66.

- Yoneya, T., Tihara, T., Nagao, K., Yamada, Y., Yamamoto, T., Osawa, M., Miyatani, S. y Nishikawa, M. (2001). Molecular cloning of delta-4, a new mouse and human Notch ligand. *J Biochem* 129:27-34.
- 5 Yoo, J. U., Barthel, T.S., Nishimura, K., Solchaga, L., Caplan, A. I., Goldberg, V. M., Johnstone, B. (1998). The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am.* 12:1745-57.
- Young, H. et al., Patente de los EE. UU. N.º 5.827.735
- Zambrowicz, B. P., Imamoto, A., Hering, S., Herzenberg, L. A., Kerr, W. G. y Soriano, P. (1997). Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94:3789-94.
- 10 Zaret, K.S. (2000). Liver specification and early morphogenesis. *Mech Dev* 92:83- 88.
- Zaret, K.S. (2001). Hepatocyte differentiation: from the endoderm and beyond. *Curr Opin Genet Dev.* 11:568-574.
- Zelko, I. y Negishi, M. (2000). Phenobarbital-elicited activation of nuclear receptor CAR in induction of cytochrome P450 genes. *Biochem Biophys Res Commun.* 277:1-6.
- 15 Zhao, R. C. H., Jiang, Y. y Verfaillie, C. M. (2000). A model of human p210BCW"BL mediated CML by transducing primary normal human CD34+ cells with a BCR/ABL containing retroviral vector. *Blood.* 97:2406-12.
- Ziegler, B., M. Valtieri, G. Porada, R. De Maria, R. Muller, B. Masella, M. Gabbianelli, I. Casella, E. Pelosi, T. Bock, E. Zanjani y C. Peschle. (1999). KDR Receptor: A Key Marker Defining HSCs. *Science.* 285:1553 1558.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para obtener una población de células madre adultas multipotentes de mamíferos que no son células germinales ni embrionarias y que pueden ser inducidas a diferenciarse en al menos un tipo celular diferenciado de cada una de las estirpes embrionarias mesodérmicas, ectodérmicas y endodérmicas, donde las células expresan oct4 y telomerasa, y donde el método comprende:
- a) proporcionar una muestra de sangre del cordón umbilical o de la placenta
 - b) establecer una población de células adherentes
 - 10 c) eliminar la población de células CD45⁺ presentes en las células;
 - d) recuperar las células CD45⁻ y cultivar las células CD45⁻ en un medio de cultivo que comprende FCE y FCDP;
 - e) seleccionar las células que expresan oct4 y telomerasa;
 - f) cultivar las células para formar una población y
 - 15 g) aislar la población de células madre adultas multipotentes de mamíferos.
2. El método de cual quiera de las reivindicaciones precedentes, que además comprende cultivar las células en presencia de un factor de diferenciación y de este modo generar una célula diferenciada.
- 20 3. El método de la reivindicación 2, donde el factor de diferenciación se selecciona del grupo constituido por factor de crecimiento de fibroblastos básico (FCFb); factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV); sulfóxido de dimetilo (DMSO) e isoproterenol; y factor de crecimiento de fibroblastos 4 (FCF4) y factor de crecimiento de hepatocitos (FCH).
- 25 4. El método de la reivindicación 1, que comprende el paso adicional de producir un medicamento para uso en el injerto de células multipotentes en un tejido.
5. El método de cualquier reivindicación precedente, que además comprende producir un medicamento farmacéutico que comprende mezclar las células y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 30 6. El método de cualquier reivindicación precedente, donde la célula posee la capacidad de ser inducida a diferenciarse para formar células seleccionadas del grupo constituido por tipos celulares oligodendrocíticos, neuronales, neurogliales, hematopoyéticos, pancreáticos, hepáticos, epiteliales, endoteliales, oculares, de músculo cardíaco, músculo liso, músculo esquelético, estroma medular, fibroblastos, adipocitos, condrocitos y osteoblastos.
- 35 7. El método de cualquier reivindicación precedente, donde las células no forman teratomas cuando se administran a un paciente.

Fig. 1

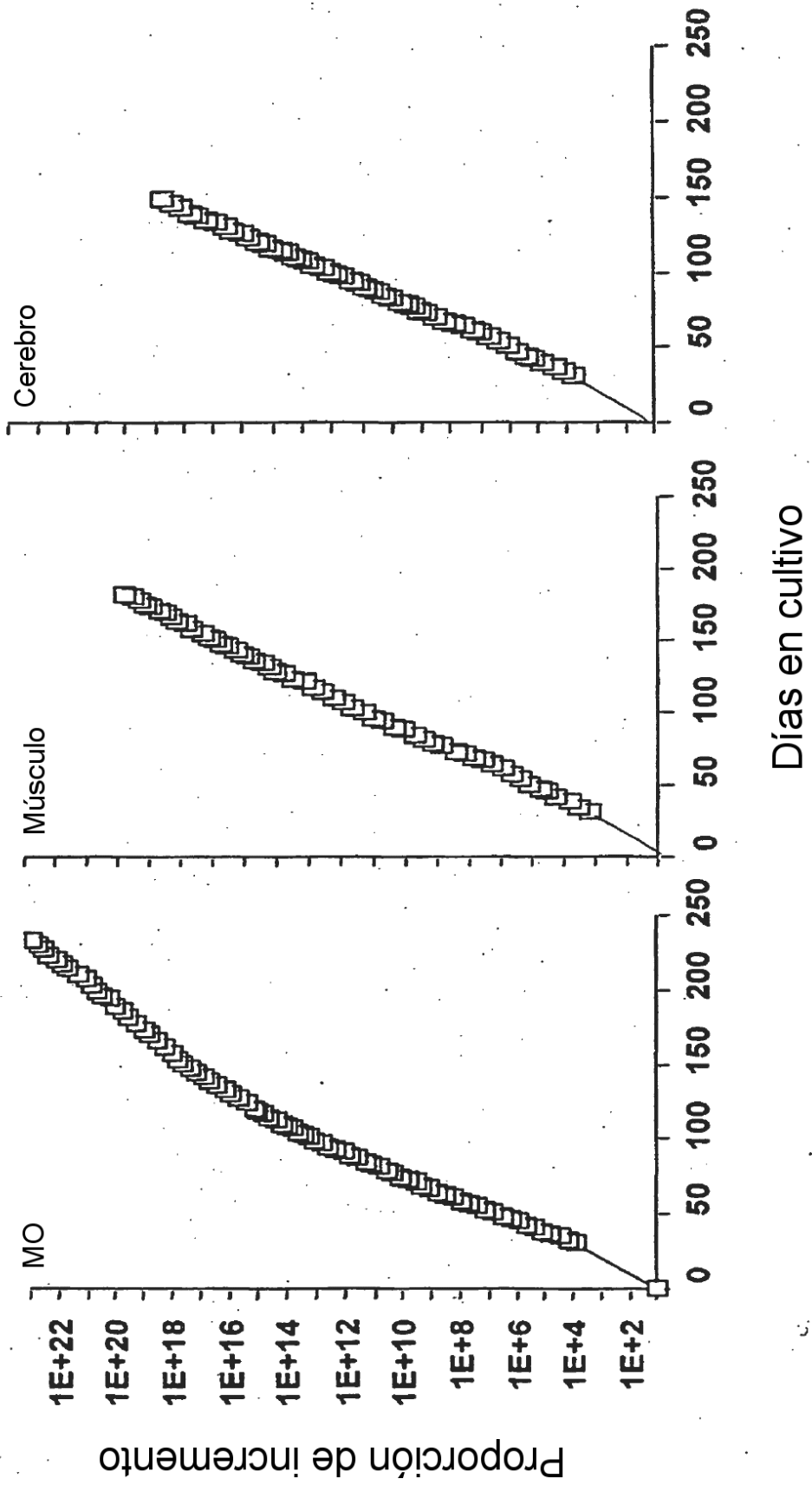


Fig. 2

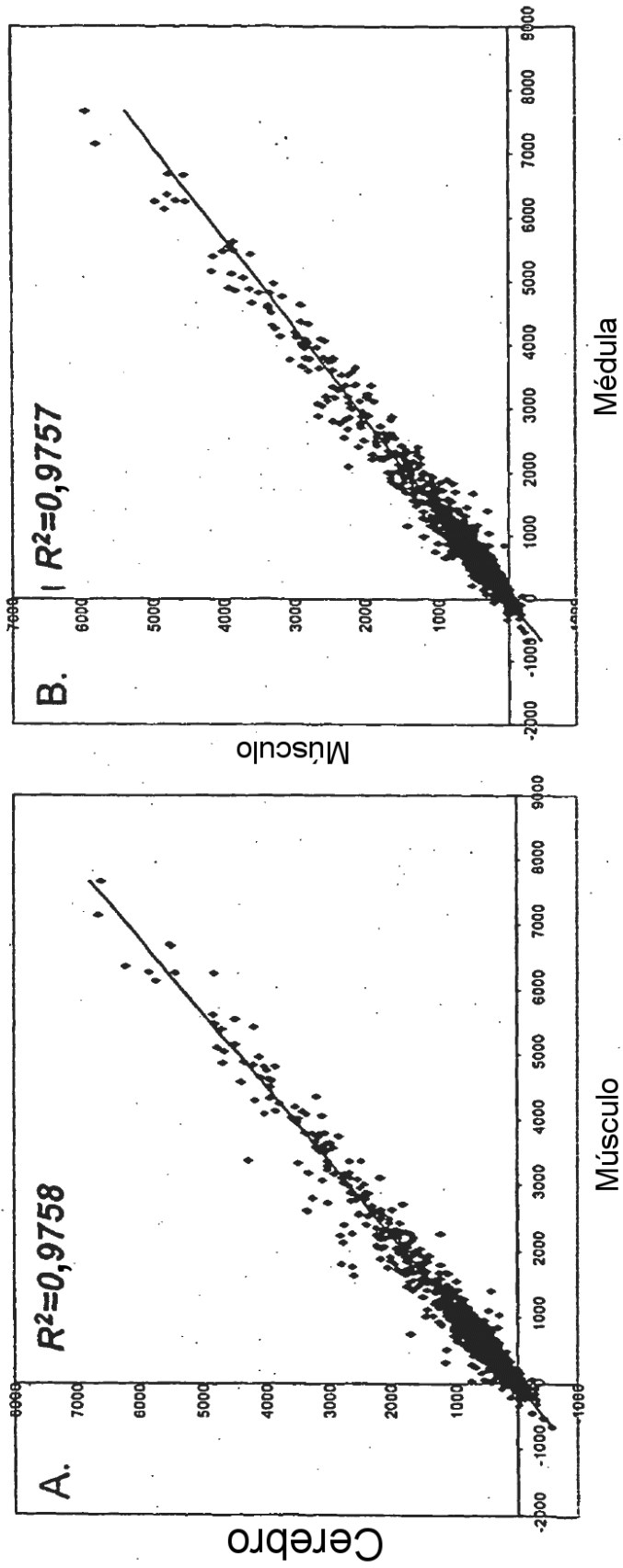


Fig. 3

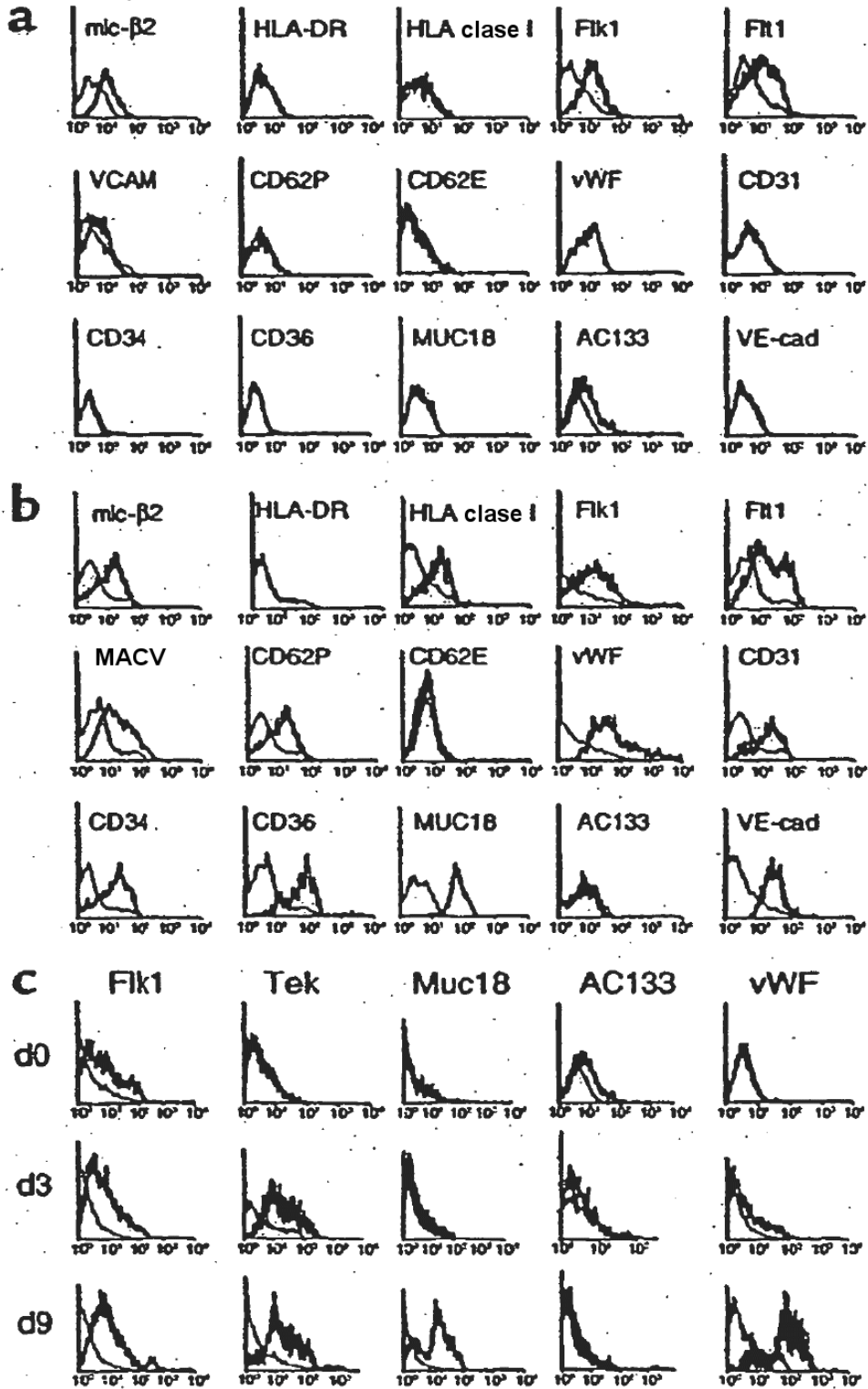


Fig. 4

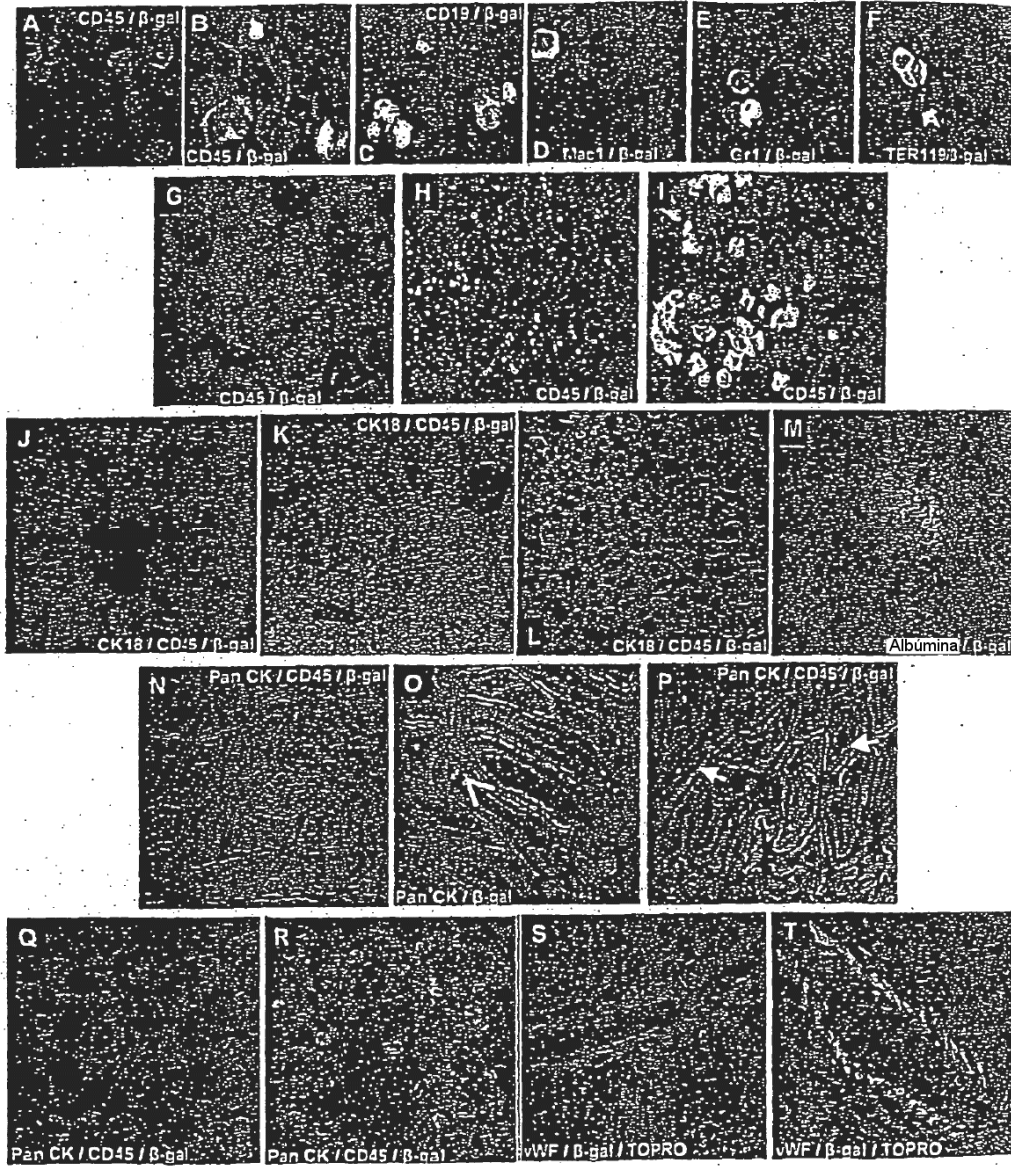


Fig. 5

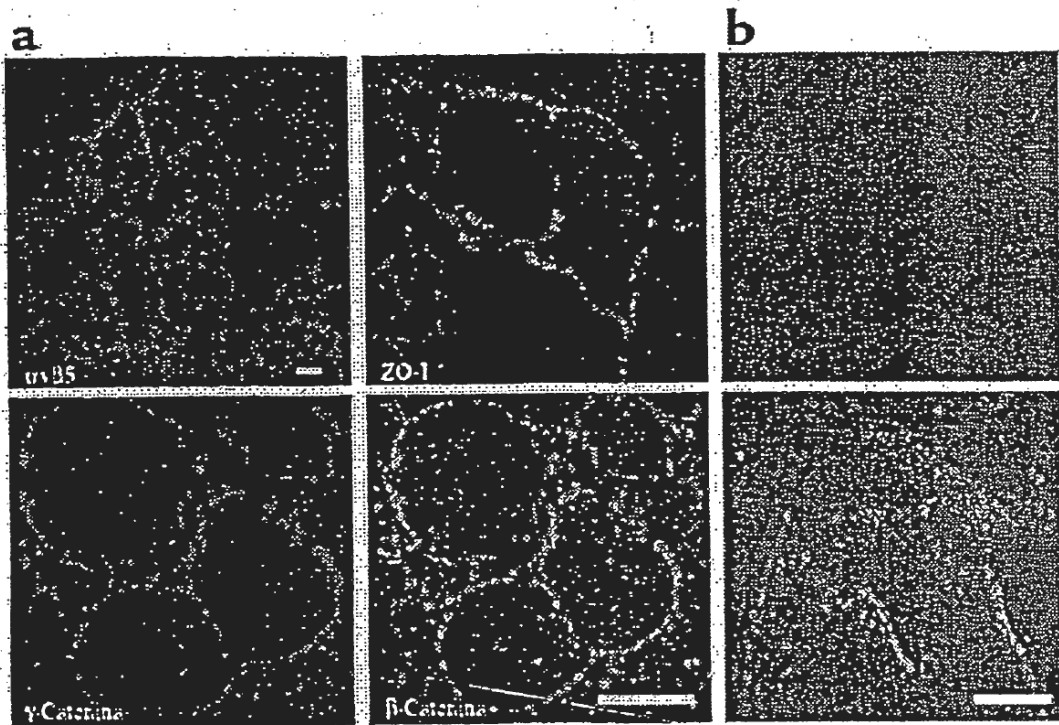


Fig. 6

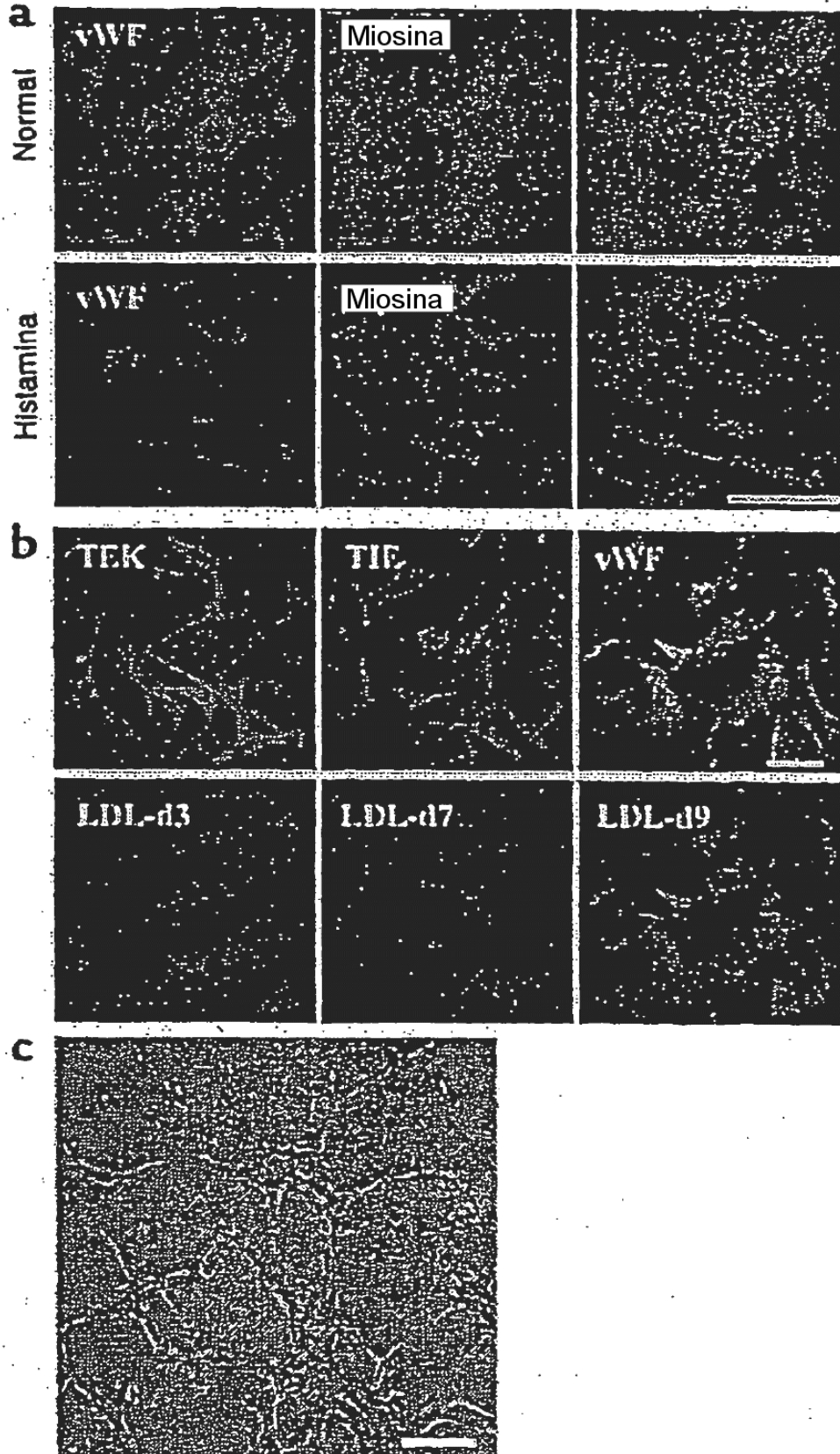


Fig. 7

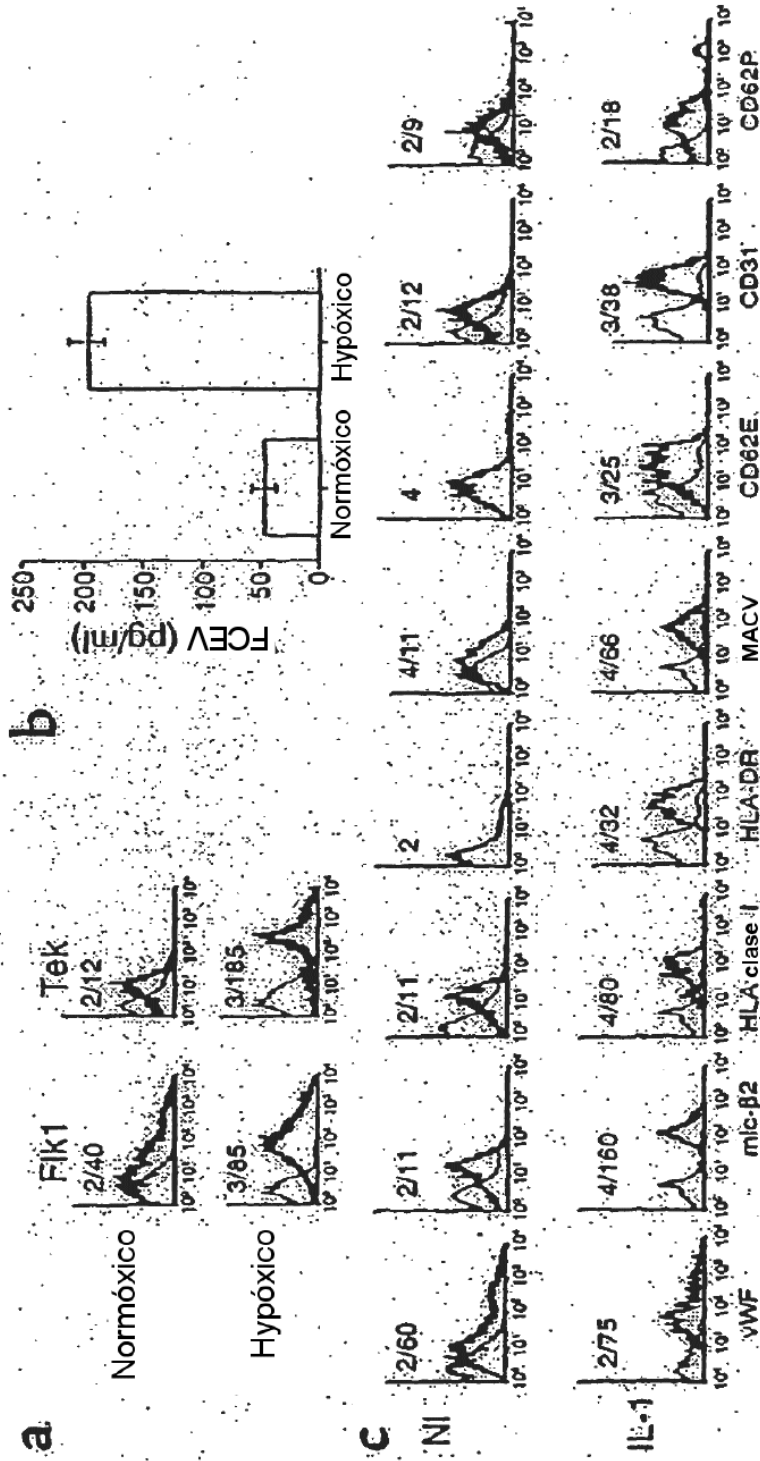


Fig. 8

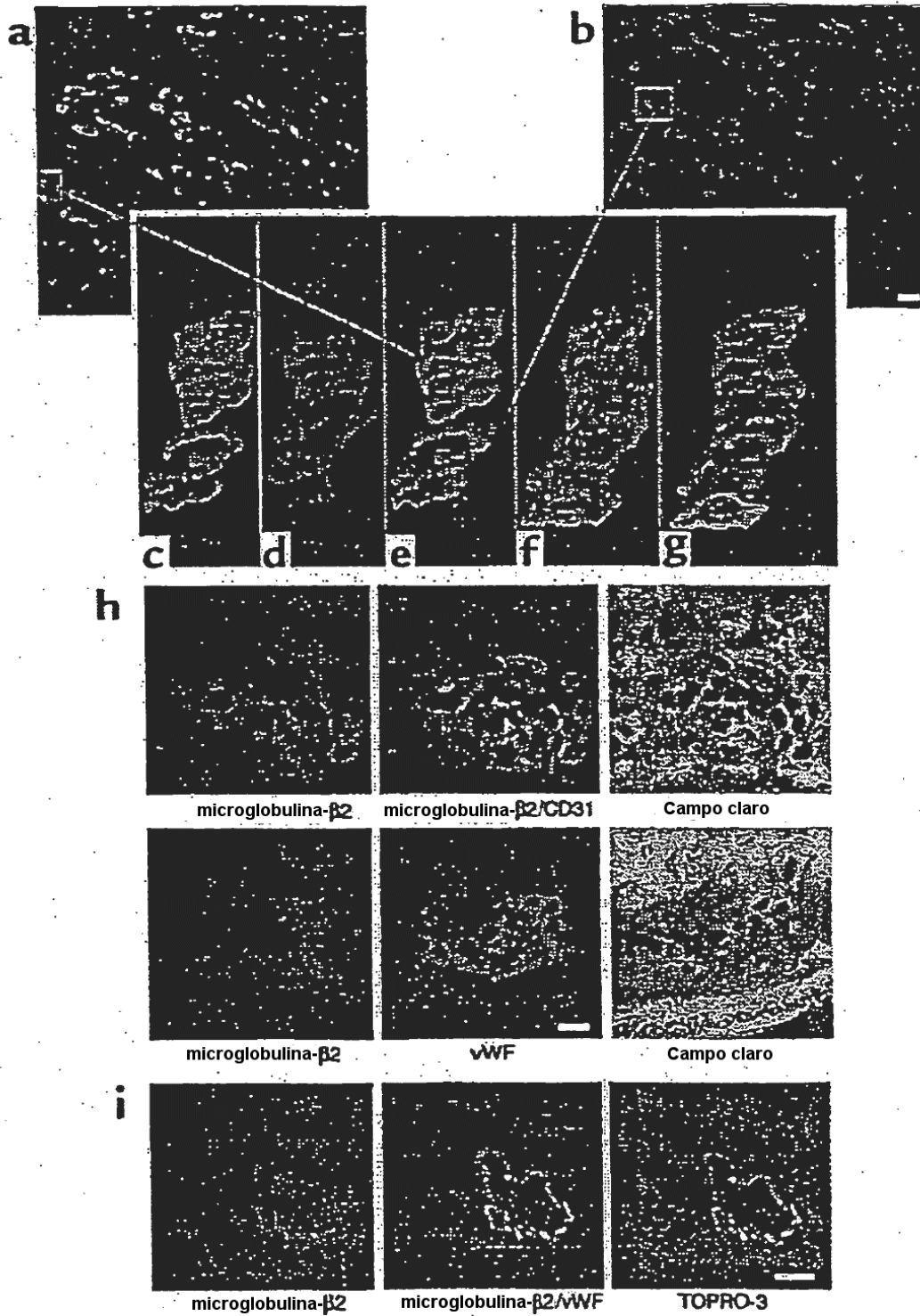


Fig. 9

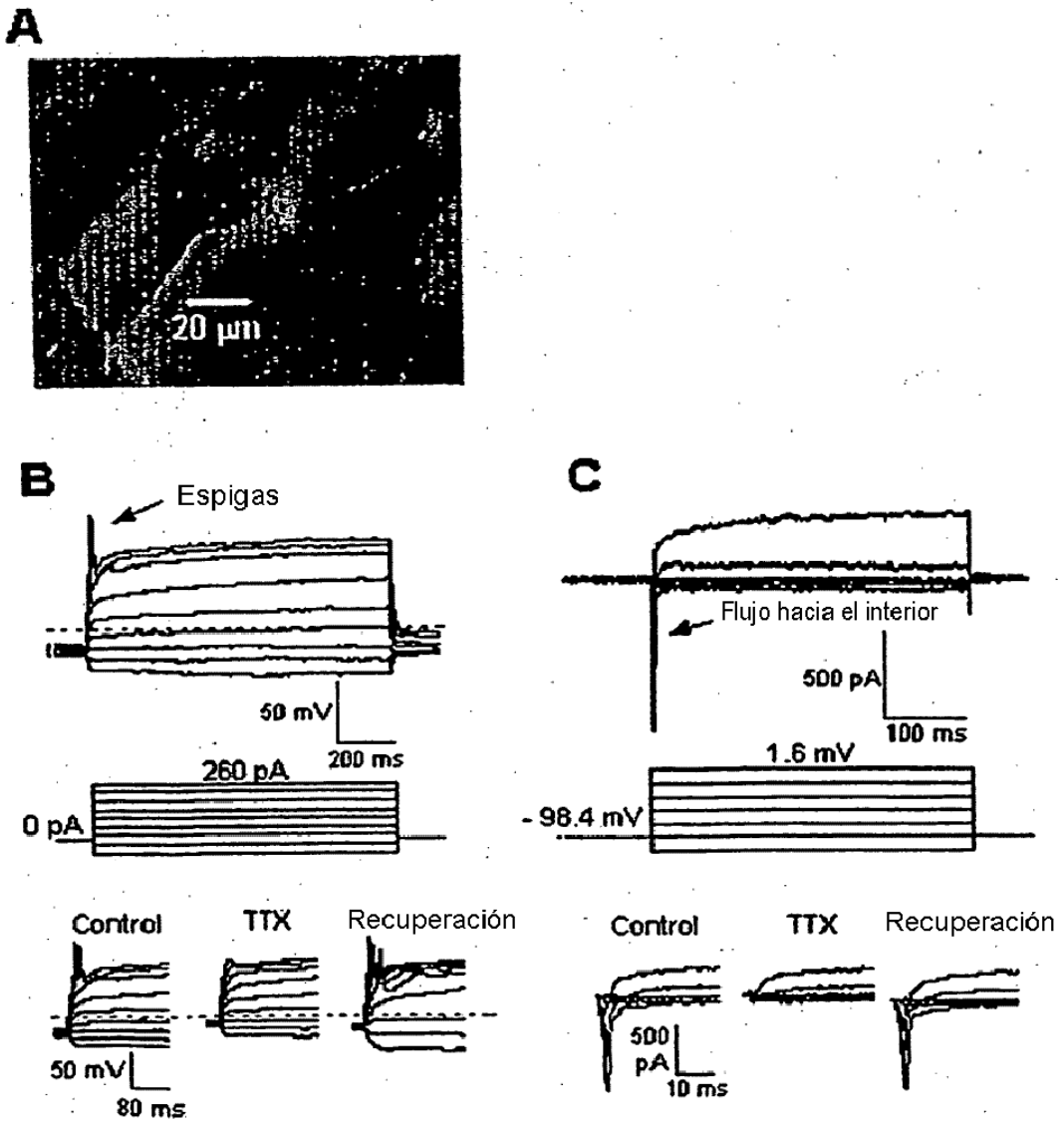


Fig. 10

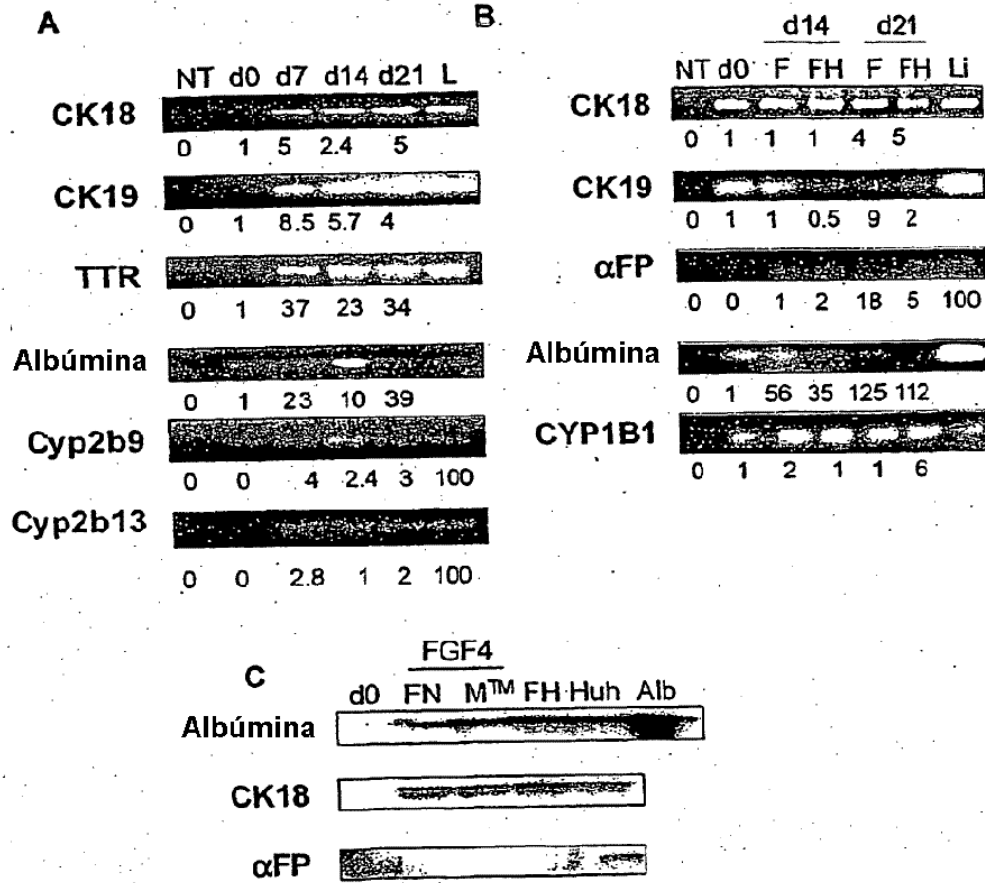


Fig. 11

