

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 157**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0775 (2010.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G06F 19/00 (2011.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2010 E 10803953 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2013 EP 2460876**

54 Título: **Método de identificación de células madre mesenquimales senescentes**

30 Prioridad:

30.07.2009 ES 200930540

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

28.02.2014

73 Titular/es:

**CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES
CARDIOVASCULARES (CNIC) (100.0%)
C/ Melchor Fernández Almagro 3
28029 Madrid, ES**

72 Inventor/es:

**SAMPER RODRÍGUEZ, ENRIQUE;
ESTRADA RODRÍGUEZ, JUAN CAMILO y
BERNAD MIANA, ANTONIO**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 445 157 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

Método de identificación de células madre mesenquimales senescentes

La presente invención se encuadra en el campo de la biología celular y la genética y hace referencia a un método para identificar células madre mesenquimales senescentes que se cultivan en cultivos *in vitro*, y comprende: medir la longitud de los telómeros en los cromosomas, determinar el nivel de ploidía en la célula, detectar la presencia de mitosis multipolar y analizar el nivel de expresión de los genes SCIN, AKAP9, EDN-1, CXCL1, CXCL12 y/o CD70. Este método puede ser de utilidad para la realización de estudios de estabilidad genética en los cultivos de células madre mesenquimales, lo que permite identificar y seleccionar las células más estables y apropiadas para ser utilizadas en la terapia celular.

Antecedentes de la invención

Las células madre mesenquimales humanas (hMSC) han sido propuestas en los últimos años como una poderosa herramienta en terapia celular por su elevado potencial para proliferar y diferenciarse en células derivadas del mesodermo (osteocitos, condrocitos y adipocitos). Esta característica permite su uso en el tratamiento de algunas patologías asociadas con inflamación crónica, envejecimiento, enfermedades autoinmunes y patologías asociadas a traumas, tales como por ejemplo la enfermedad del injerto contra el huésped, las fistulas relacionadas con la enfermedad de Chron, la artritis reumatoide, el infarto de miocardio o condiciones degenerativas de cartilago y hueso.

No obstante, aunque existen fuentes de MSCs disponibles en diferentes tejidos, su cantidad en el cuerpo es escasa. La mayoría de los protocolos de terapia celular utilizan entre 10-50 millones de hMSCs por tratamiento, por lo que estas células necesitan ser expandidas en cultivos *in vitro* durante 4 a 8 semanas antes de su implantación. Además, estos cultivos con frecuencia se llevan a cabo en presencia de condiciones pre-oxidativas (20% de O₂) y de concentraciones elevadas de suero y glucosa donde las células pueden sufrir mutaciones y aberraciones cromosómicas que ponen en peligro su bioseguridad si van a ser utilizadas en clínica. Estos largos períodos de cultivo y el daño oxidativo contribuyen a la senescencia celular y a la inestabilidad genética, lo que puede alterar las propiedades de las células, limitando su utilidad biomédica.

La senescencia está mediada principalmente por la activación de los genes supresores tumorales que detienen el ciclo celular, p15/p16/Rb y p19^{arf}/p53/p21 (US2002123526 A1). Además, las células senescentes sobreexpresan marcadores asociados al estrés como SA-β-galactosidasa o Lipofuscina (Krzysztof Ksiazek, 2009, *Rejuvenation Research*, Vol. 12, No. 2: 105-116), así como programas que incrementan el nivel de citocinas pro-inflamatorias. Sin embargo, es necesaria la identificación de biomarcadores de senescencia más específicos para detectar el nivel de senescencia en los cultivos de células madre mesenquimales para la realización de controles de calidad antes de su aplicación biomédica.

Las células senescentes muestran cambios en algunos de sus parámetros fisiológicos y modifican las características de las células vecinas. La poliploidia (duplicaciones de todo el conjunto de cromosomas) constituye un marcador de estrés celular en la mayoría de los tejidos y se cree que es un mecanismo precursor de la aneuploidia, la cual se considera un factor fundamental asociado con el envejecimiento y con la transformación celular, ya que la mayoría de los tumores son aneuploides. Algunos autores han demostrado la presencia de aneuploidia en células madre mesenquimales que se originan en la médula ósea de primates no humanos, creciendo en cultivos (Reza Izadpanah, et al., 2008, *Cancer Research*, Vol. 68, No. 11: 4229-4238). Por lo tanto, la aneuploidia ha sido propuesta como otra característica de las células senescentes (Steven R. Schwarze, et al., 2005, *Neoplasia*, Vol. 7, No. 9: 816-823). Estudios previos han demostrado que durante el cultivo celular prolongado de las células madre embrionarias humanas existe una predisposición para el mantenimiento y la selección de aneuploidias cromosómicas específicas para los cromosomas 12, 17, X y 20q, que posiblemente proporcionan una ventaja selectiva para la propagación de las células madre embrionarias humanas que se mantienen indefinidamente en cultivo (Spits, C. et al., 2008, *Nature Biotechnology*, Vol. 26:1361-1363).

Uno de los mecanismos principales para la inducción de senescencia en las células es el acortamiento de los telómeros. Los telómeros son los extremos terminales de los cromosomas eucariotas y son cruciales para mantener la estabilidad genética: el mantenimiento de la longitud y la función de los telómeros es un requisito para la división celular y para una correcta segregación cromosómica. Este proceso de mantenimiento en la mayoría de las células es realizado por la telomerasa transcriptasa inversa que añade repeticiones al final de los cromosomas. La senescencia de las células madre mesenquimales se ha asociado con un acortamiento progresivo de los extremos de los telómeros con ciclos de cultivo sucesivos (Melissa A. Baxter, et al., 2004, *Stem Cells*, 22:675-682).

Otra de las aproximaciones investigadas para la detección de biomarcadores de senescencia en células madre mesenquimales en cultivo, es el análisis de la expresión genética de todo el transcriptoma de estas células para identificar aquellos genes que se expresan de manera diferente en las células senescentes y en las no senescentes.

Los genes identificados para su uso como biomarcadores de senescencia en su mayoría se encuentran relacionados con la proliferación celular, la respuesta a estrés, el desarrollo, el ciclo celular, la mitosis, la replicación y reparación del ADN, etc. (Eunsook Ryu, et al., 2008, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 371:431–436).

- 5 Otros estudios basados en la identificación de biomarcadores de senescencia han investigado el impacto de la senescencia en el fenotipo, la diferenciación y los patrones de expresión génica global de las MSC que crecen en cultivo. Así, se ha asociado un acortamiento de los telómeros de los cromosomas y una expresión reducida de algunos de los genes implicados en la replicación y reparación del ADN con la senescencia en estas células (Wolfgang Wagner, et al., 2008, PLoS ONE, Vol. 3, No. 5).
- 10 De manera que el acortamiento de los telómeros, la aneuploidia y los cambios en los patrones de expresión génica en comparación con las células no senescentes son características que han sido asociadas con el fenotipo senescente. No obstante, es necesario disponer de un método completo, que sea fiable y reproducible, que analice todos los parámetros implicados en el desarrollo de la senescencia, y que sea capaz de detectar células madre mesenquimales senescentes en cultivo. Este método permitirá el análisis de su estabilidad genética, lo cual es de especial relevancia, dadas las importantes aplicaciones de estas células en el campo de la terapia celular.
- 15

Descripción de la invención

La presente invención proporciona un método para identificar células madre mesenquimales senescentes que crecen en cultivos *in vitro*, que comprende: medir la longitud media de los telómeros de los cromosomas, determinar el nivel de ploidía en la célula, analizar el número de mitosis multipolares y determinar el nivel de expresión de los genes SCIN (escinderina), EDN-1 (endotelina-1), AKAP9 (proteína de anclaje Kinasa A 9; Yotiao), CXCL12, CXCL1 y CD70, implicados en el control de la ploidía y la poliploidización. Este método puede ser de utilidad para la realización de estudios de estabilidad genética en los cultivos de células madre mesenquimales, lo que permite la identificación y selección de las células más adecuadas y estables para ser utilizadas en terapia celular.

20

Los inventores han llevado a cabo un análisis de la expresión genética diferencial de células madre mesenquimales en el pase 21 y en el pase 2 de un cultivo en presencia de 20% de O₂ para descubrir qué genes se expresan de manera diferente en las dos poblaciones y si esta diferencia en la expresión es significativa. Tras llevar a cabo un análisis para conocer qué genes de expresión alterada están implicados en procesos de inestabilidad genética, han demostrado que existen 69 genes modificados implicados en procesos de cáncer y del ciclo celular. De todos estos genes en los que la expresión se encuentra modificada en la senescencia, se seleccionaron un total de 8 con la expresión diferencial más significativa que están implicados en el mantenimiento del nivel de ploidía.

25

30

En base a este análisis, se llegó a la conclusión de que la senescencia de las células madre mesenquimales está relacionada con la sobreexpresión de SCIN (escinderina), EDN-1 (endotelina-1) y/o AKAP9 (proteína de anclaje Kinasa A 9; Yotiao), y/o con una reducción en la expresión de CXCL12, CXCL1 y/o CD70 implicados en el control de la ploidía y la poliploidización. Por lo tanto, estos genes se proponen en la presente invención como biomarcadores de la inestabilidad genética en cultivos de células madre mesenquimales.

35

Además, las MSC humanas senescentes muestran una reducción significativa de la longitud telomérica y elevados niveles de aneuploidia y de mitosis multipolares, que están relacionados con la disminución en la expresión de los genes que controlan la ploidía. Por lo tanto, el método de la presente invención comprende el análisis de todos estos parámetros de senescencia conjuntamente para detectar senescencia en las MSC que están siendo expandidas en cultivos *in vitro*.

40

Por tanto, un primer aspecto de la invención hace referencia a un método para la identificación de células madre mesenquimales senescentes, al que se hará referencia de ahora en adelante como "método de la invención", que comprende:

- a. medir la longitud de los telómeros de los cromosomas de la célula madre mesenquimal,
- 45 b. determinar el nivel de ploidía de la célula madre mesenquimal del paso (a),
- c. analizar la presencia de mitosis multipolar en la célula madre mesenquimal del paso (b),
- d. analizar el nivel de expresión de los genes SCIN, EDN-1, AKAP9, CXCL1, CXCL12 y/o CD70 en la célula madre mesenquimal del paso (c), y
- e. asociar los datos obtenidos en los pasos (a)-(d) con un fenotipo senescente.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la medición de la longitud de los telómeros de los cromosomas del paso (a) se realiza mediante al menos uno de los siguientes métodos: FISH cuantitativo o TRAP. En otra realización preferida, la determinación del nivel de ploidía del paso (b) se realiza mediante hibridación con sondas cromosómicas específicas y un posterior recuento de sus señales fluorescentes. En otra realización preferida las sondas cromosómicas específicas son sondas CEP. En una realización más preferente, las sondas CEP son específicas de los cromosomas 8, 10, 11 y/o 17. En una realización aún más preferente, las sondas CEP son específicas del cromosoma 10.

En la presente invención, se entiende por “células madre mesenquimales” o “células progenitoras mesenquimales” las células madre adultas que se encuentran distribuidas en el tejido conectivo de diversos órganos como la médula ósea, la sangre periférica, el cordón umbilical, el hueso trabecular, el tejido adiposo, el tejido sinovial, los dientes deciduales, el músculo esquelético y además en algunos tejidos del feto, en los que los marcadores característicos incluyen, pero no se limitan a, SH2, SH3, SH4, CD10, CD13, CD29, CD44, CD54, CD73, CD90, CD105 y CD166, y son negativas para los marcadores CD31, CD34, CD38, CD40 o CD45. Estas células poseen la capacidad de diferenciarse en múltiples líneas celulares del mesodermo, tales como células de las líneas celulares osteogénica, adipogénica o condrogénica.

Estas células madre mesenquimales, para poder ser aplicadas en terapia celular, como por ejemplo en regeneración tisular, necesitan ser expandidas en cultivos *in vitro* que proporcionen cantidades celulares terapéuticamente útiles. No obstante, después de un cierto número de divisiones estas células se vuelven senescentes y alcanzan los límites a su capacidad proliferativa, su potencial de diferenciación, su estabilidad genética, etc. Se entiende por “senescencia” el fenómeno que induce cambios en algunos parámetros de la fisiología celular, limita la capacidad proliferativa, la replicación, la diferenciación, etc. de las células, además de cambiar los patrones de expresión génica. Puede ser inducida por varias fuentes de estrés como la irradiación ionizante, la activación oncogénica, el acortamiento de los telómeros, la reparación incompleta del ADN, las perturbaciones de la cromatina o el daño oxidativo y está asociada con respuestas al daño en el ADN. Las células que se cultivan en cultivos *in vitro* durante un tiempo prolongado manifiestan senescencia.

Para identificar una célula madre mesenquimal como senescente, el método de la invención comprende, en primer lugar, la medición de la longitud de los telómeros de los cromosomas de la célula, debido a que la reducción de la longitud telomérica es una de las características que se encuentran asociadas al fenotipo senescente. Los “telómeros” son las regiones de ADN no codificantes que se encuentran en los extremos de los cromosomas lineales. En los cromosomas de las células humanas, los telómeros están formados por unas 2.000 repeticiones en tándem de la secuencia telomérica “TTAGGG/AATCCC”. Los telómeros están implicados en numerosas funciones celulares relacionadas con la estabilidad de los cromosomas y la división celular.

La medición de la longitud telomérica se puede llevar a cabo mediante cualquier método conocido en el estado del arte, como por ejemplo, pero sin limitarse a, *slot-blot*, TRF o análisis de los fragmentos de restricción terminal, obtenidos mediante la digestión del ADN con enzimas de restricción, y posterior Southern blot, TRAP o “Protocolo de Amplificación de Repeticiones Teloméricas (PART)” que analiza los niveles de actividad de la telomerasa, hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) cuantitativa o no cuantitativa, y síntesis *in situ* con cebado (PRINS, del inglés “Primed In Situ Syntesis”). En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la medición de la longitud de los telómeros de los cromosomas se realiza mediante FISH cuantitativo y/o TRAP, cuyos protocolos se describen en los ejemplos de la presente invención. En el método de la invención, no es necesario llevar a cabo los dos métodos, FISH cuantitativo y TRAP, para medir la longitud telomérica ya que cualquiera de ellos por sí mismo aporta información suficiente de este parámetro. Sin embargo, es preferible que se realicen ambos para obtener una información más completa porque el método TRAP aporta evidencias sobre la actividad de la telomerasa, enzima que mantiene la longitud telomérica. Por lo tanto, en una realización preferida la medición de la longitud de los telómeros de los cromosomas en el paso (a) se realiza mediante FISH cuantitativo, en otra realización preferida la medición de la longitud de los telómeros de los cromosomas se realiza mediante TRAP, y en una realización más preferente esta medición se realiza mediante FISH cuantitativo y TRAP.

En segundo lugar, el método de la invención comprende analizar el nivel de ploidía de la célula madre mesenquimal. Por “nivel de ploidía” se entiende el número de conjuntos completos de cromosomas en una célula, por ejemplo, 2n, 3n, 4n, etc. Las células somáticas humanas son diploides (2n) y cualquier cambio en este número de conjuntos cromosómicos se entiende como “aneuploidia”. La determinación del nivel de ploidía en una célula se puede realizar mediante técnicas citogenéticas que incluyen, pero no se limitan a, el uso de sondas que identifican estructuras específicas y/o repetitivas de los cromosomas, tales como por ejemplo, pero sin limitarse a, FISH con sondas centroméricas, como por ejemplo pero sin limitarse a las mismas, sondas CEP o LS1, DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) o sondas específicas cromosómicas o mediante el Sistema ImagePath™ para el estudio de la ploidía del ADN. En una realización preferida, la determinación del nivel de ploidía de la célula madre mesenquimal se realiza mediante la hibridación con sondas centroméricas específicas cromosómicas, de manera específica pero sin limitarse a, sondas CEP, conocidas en el estado del arte. Estas sondas pueden ser específicas para cualquier cromosoma, ya que la señal de hibridación fluorescente de estas sondas con cualquier cromosoma permite obtener información sobre el nivel de ploidía celular. Pero en la presente invención, estas sondas preferiblemente son

específicas de los cromosomas 8, 10, 11 y/o 17, ya que se ha podido comprobar que durante el cultivo celular prolongado se produce un aumento progresivo de los niveles de aneuploidia para estos cuatro cromosomas (preferentemente hacia un aumento en el número de copias). Este aumento del nivel de ploidía es especialmente marcado en el caso del cromosoma 10, como se muestra en los ejemplos y figuras de la presente invención. Por lo tanto, en una realización preferida, la determinación del nivel de ploidía en el paso (b) se realiza mediante la hibridación con sondas cromosómicas de enumaeración específicas CEP del cromosoma 10 y un ensayo posterior de su señal fluorescente.

El posterior análisis de la señal fluorescente de estas sondas permite visualizar el número de cada uno de estos cromosomas en la célula, de manera que en los casos en los que más o menos de dos señales por sonda cromosómica son detectadas existe aneuploidia.

El tercer paso del método de la invención comprende analizar la presencia en la célula de mitosis multipolar. Se entiende por "mitosis multipolar" aquella división celular en la que el huso tiene tres o más polos, dando lugar a la formación del número correspondiente de células hijas. La mitosis multipolar puede ser una causa de poliploidía en las células. El análisis de mitosis multipolar podría llevarse a cabo, por ejemplo, pero sin limitarse a, mediante cualquier técnica citológica conocida en el estado de la técnica que permita el análisis del núcleo celular, como por ejemplo, pero sin limitarse a, la tinción con anticuerpos anti-tubulina.

Un cuarto paso del método de la invención comprende la determinación del nivel de expresión de los genes SCIN (escinderina), EDN-1 (endotelina-1), AKAP9 (proteína de anclaje Kinasa A 9; Yotiao), CXCL12 (ligando de quimiocina 12, Factor derivado del estroma-1), CXCL1 (ligando de quimiocina 1, Gro-alfa) y/o CD70 (molécula CD70) en las células madres mesenquimales. El análisis de la expresión de estos genes puede realizarse mediante, por ejemplo, pero sin limitarse a, PCR, RT-PCR, técnicas inmunohistoquímicas de detección de estas proteínas en la célula, micromatrices de proteínas, micromatrices de ADNc, western blot, análisis de sus niveles de ARNm en la célula mediante, por ejemplo pero sin limitarse a, la cuantificación de señales de sondas fluorescentes de ARNm, etc. El método de análisis de la expresión de estos genes que se lleva a cabo en el método de la invención es preferiblemente el que se describe en los ejemplos.

El último paso del método de la invención consiste en asociar los datos obtenidos de la medición de la longitud de los telómeros de los cromosomas, determinación del nivel de ploidía, del análisis de la presencia de mitosis multipolar y de la determinación del nivel de expresión de los genes anteriormente mencionados en la célula madre mesenquimal con un fenotipo senescente.

Por lo tanto, en otra realización preferida de este aspecto de la invención, el fenotipo senescente del paso (e) se caracteriza por presentar:

- a. una reducción en la longitud de los telómeros de los cromosomas en comparación con una célula no senescente,
- b. aneuploidia,
- c. mitosis multipolar,
- d. una expresión elevada de los genes SCIN, AKAP9 y/o EDN-1, y/o
- e. una expresión reducida de los genes CXCL1, CXCL12 y/o CD70.

La reducción en la longitud de los telómeros de los cromosomas del paso (a) se puede determinar mediante la comparación de la longitud de los telómeros de los cromosomas de la célula madre mesenquimal senescente con una célula madre mesenquimal no senescente. La aneuploidia se entiende, en el fenotipo senescente, como el aumento o la disminución en el número de copias de los cromosomas 8, 10, 11 y/o 17, pero sin limitarse a ellos, en comparación con el número normal de copias de los mismos en una célula no senescente, es decir, un cambio en el número de copias de estos cromosomas por encima o por debajo de dos, como se ha explicado anteriormente. La aneuploidia del fenotipo senescente de la invención se caracteriza por presentar un aumento en el número de copias de los cromosomas 8, 10, 11 y/o 17 y más preferiblemente del cromosoma 10, entendiéndose como "aumento en el número de copias" la presencia de una o más copias de estos cromosomas en la célula por encima del número normal de copias de los mismos en una célula no senescente, es decir, una o más copias de estos cromosomas mayor a dos.

La mitosis multipolar se entiende, en el fenotipo senescente, como la presencia de divisiones celulares en las que el huso tiene tres o más polos.

Se entiende por “expresión elevada” aquella expresión en la que los niveles de los genes SCIN, AKAP9 y EDN-1 son más elevados que los niveles de expresión de estos mismos genes en una célula madre mesenquimal no senescente. De igual manera, una “expresión reducida” es aquella expresión en la que los niveles de los genes SCIN, AKAP9 y EDN-1 son inferiores a los niveles de expresión de estos mismos genes en una célula madre mesenquimal no senescente.

En la presente invención también se ha determinado la existencia de otros biomarcadores relacionados con la estabilidad genética y como consecuencia, con la senescencia.

El primer grupo de genes relacionados con la estabilidad genética son, tal como se muestra en la tabla 3 del apartado de ejemplos de la presente invención, HIST2H2AC, HIST1H4C, HIST1H2BK, HIST1H4L, HIST1H2BE, HIST1H4B, HIST1H2BO, HIST1H4D, HIST1H2BL, HIST1H2BF, HIST1H2BH, HIST1H3D, HIST1H1A, HIST1H2BI, HIST1H1B, HIST1H2BB, HIST1H2AE, HMGA1, HIST1H2BC, HIST1H1C, HIST1H2BD, HIST1H2BM, HIST1H2BJ, HIST1H2BN, HIST2H2AA4, HIST2H2BE y HIST1H2AD. Estos genes pueden detectarse de forma aislada o en cualquier combinación, incluyendo la combinación de todos ellos, o de cualquiera de ellos, o de la combinación de cualquier biomarcador de este grupo con cualquier biomarcador de cualquiera de los grupos mencionados en la presente invención.

Por tanto, el fenotipo senescente se caracteriza por presentar:

- una expresión elevada de los genes que codifican para las histonas de la familia H2B: HIST1H2BK, HIST1H2BE, HIST1H2BO, HIST1H2BL, HIST1H2BF, HIST1H2BH, HIST1H2BI, HIST1H2BB, HIST1H2BC, HIST1H2BD, HIST1H2BM, HIST1H2BJ, HIST1H2BN o HIST1H2AD, y/o

- una expresión reducida de los genes que codifican para las histonas de la familia H4: HIST1H4C, HIST1H4L, HIST1H4B o HIST1H4D, y/o

- una expresión elevada de los genes que codifican para las histonas HIST1H3D, HIST1H2AE, HIST1H1C, HIST2H2AA4 o HIST1H2AD, y/o

- una expresión reducida de los genes que codifican para HIST2H2AC, HIST1H1A, HIST1H1B o la proteína no histona HMGA1.

Otro grupo de genes relacionados con la segregación cromosómica durante la mitosis son, tal como se muestra en la tabla 4 del apartado de ejemplos de la presente invención, CENPM, CENPO, CENPA, CENPN, CENPV, CENPK, CENPF y CENPQ. Estos genes pueden detectarse de forma aislada o en cualquier combinación, incluyendo la combinación de todos ellos, o de cualquiera de ellos, o la combinación de cualquier biomarcador de este grupo con cualquier biomarcador de cualquiera de los grupos mencionados en la presente invención.

Por lo tanto, el fenotipo senescente se caracteriza por presentar:

- una expresión reducida de los genes que codifican para las proteínas del complejo asociado al centrómero (CENP-NAC): CENPM, CENPO, CENPA, CENPN, CENPV, CENPK y CENPF, y/o

- una expresión elevada del gen CENPQ.

Otro grupo más de genes relacionados con la estabilidad del centrosoma, centrómero y cinetocoro (subfunciones que afectan a la segregación cromosómica) son, tal como puede observarse en la tabla 5 del apartado de ejemplos de la presente invención SPC25, TNFAIP3, GTSE1, HAUS8, CDC45L, SKA1, PLK1, SKA3, KIF22, ESPL1, PXN, BIRC5, BUB1B, CCNB1, KIFC1, SPAG5, NDC80, HAUS7, EVI5, KIF4A, CDC25B, KIF20A, DYNLT3, sep-07, CEP63, CEP290 y EVI5. Estos genes pueden detectarse de forma aislada o en cualquier combinación, incluyendo la combinación de todos ellos, o de cualquiera de ellos, o de la combinación de cualquier biomarcador de este grupo con cualquier biomarcador de cualquiera de los grupos mencionados en la presente invención.

Por tanto, el fenotipo senescente se caracteriza por presentar:

- una expresión reducida de los genes SPC25, TNFAIP3, GTSE1, HAUS8, CDC45L, SKA1, PLK1, SKA3, KIF22, ESPL1, PXN, BIRC5, BUB1B, CCNB1, KIFC1, SPAG5, NDC80, HAUS7, EVI5, KIF4A, CDC25B y KIF20A, y/o

- una expresión elevada de los genes DYNLT3, sep-07, CEP63, CEP290 y EVI5.

Otra realización preferida de la presente invención hace referencia al método de identificación de células madre senescentes de la invención, donde se analiza el nivel de expresión de los genes HIST1H4C, HIST1H4L, HIST1

H1C, CENPM, DYNLT3, SPC25, GTSE1, CDC45L, PLK1 y SKA3 en la célula madre mesenquimal, y se asocian los datos obtenidos con el fenotipo senescente.

5 Es decir, la determinación del nivel de expresión de los genes HIST1H4C, HIST1H4L, HIST1H1C, CENPM, DYNLT3, SPC25, GTSE1, CDC45L, PLK1 y SKA3 se lleva a cabo en el paso (d) del método de la invención, es decir, en el paso en el que se determina el nivel de expresión de los genes SCIN, EDN-1, AKAP9, CXCL1, CXCL12 y CD70 en la célula madre mesenquimal del paso (c), y posteriormente, se asocian los datos obtenidos en los pasos (a)-(d) con un fenotipo senescente.

Una realización más preferente de la presente invención hace referencia al método de identificación de células madre mesenquimales senescentes de la invención, donde el fenotipo senescente se caracteriza por presentar:

- 10 a. una expresión elevada de los genes HIST1H1C y DYNLT3, y
- b. una expresión reducida de los genes HIST1H4C, HIST1H4L, CENPM, SPC25, GTSE1, CDC45L, PLK1 y SKA3.

15 Además de los genes SCIN, EDN-1, CXCL1, CXCL12 y CD70, se han seleccionado 10 genes adicionales que aumentan la eficacia del método de identificación de células senescentes de la invención. Estos 10 genes han sido seleccionados teniendo en cuenta su cambio en la expresión y significancia estadística (tablas 3, 4 y 5). Estos genes han sido seleccionados a partir de una nueva matriz y además están incluidos en las tres tablas de genes mencionadas anteriormente. A continuación se hace una descripción de cada uno de los genes seleccionados:

HIST1H4C GRUPO DE HISTONAS 1, H4c (Tabla 3).

HIST1H4L GRUPO DE HISTONAS 1, H4l (Tabla 3).

20 HIST1H1C GRUPO DE HISTONAS 1, H1c (Tabla 3).

CENPM PROTEINA DEL CENTRÓMERO M (Tabla 4).

DYNLT3 Dineína, cadena ligera, tipo Tctex-3 (Tabla 5).

SPC25 SPC25, NDC80 componente del complejo del cinetocoro, homólogo (*S. cerevisiae*) (Tabla 5).

GTSE1 proteína 1 expresada en Fase G-2 y S- (Tabla 5).

25 CDC45L CDC45 división del ciclo celular similar a 45 (*S. cerevisiae*) (Tabla 5).

PLK1 quinasa 1 tipo Polo (*Drosophila*) (Tabla 5).

SKA3 Subunidad 3 del Complejo asociado al huso y cinetocoro (Tabla 5).

En otra realización preferida, las células madre mesenquimales se cultivan en un cultivo *in vitro*. En otra realización preferida, las células madre mesenquimales proceden de un humano.

30 El método de la invención puede aplicarse, pero sin limitarse, a células mesenquimales que se están cultivando en cultivos *in vitro*, de manera que podría servir tanto para la identificación de senescencia en una célula mesenquimal aislada como para la identificación de senescencia en un cultivo de células madre mesenquimales que preferiblemente van a ser utilizadas en terapia celular.

35 Por tanto, el método de la invención podría ser de utilidad para la realización de estudios de estabilidad genética en los cultivos de células madre mesenquimales. En una realización preferida de este aspecto de la invención, los cultivos de células madre mesenquimales son para su uso en terapia celular.

40 La senescencia y el acortamiento de los telómeros pueden llevar a un aumento de la inestabilidad genética. Así, la identificación de células madre mesenquimales senescentes en un cultivo *in vitro* puede aportar información sobre el grado de estabilidad genética de esas células en cultivo, un parámetro que es importante para determinar la calidad de las células que van a ser empleadas para fines terapéuticos. Se entiende por "estabilidad genética" el estado en el que las células no presentan cambios significativos en sus perfiles de expresión génica en comparación con el perfil de expresión esperado en células de su mismo linaje; no muestran un elevado número de mutaciones, cambios en su nivel de ploidía, ni un elevado número de mitosis multipolares, ni cambios significativos en su longitud telomérica, etc.

Se entiende por "terapia celular" la utilización de células vivas, tanto autólogas (procedentes del propio paciente), como alogénicas (de otro ser humano) o xenogénicas (de animales), en las que las características biológicas han sido modificadas sustancialmente como resultado de su manipulación, para obtener un efecto terapéutico, de diagnóstico o preventivo, por medios metabólicos, farmacológicos o inmunológicos.

- 5 Otro aspecto de la invención hace referencia a un kit de identificación de células madre mesenquimales senescentes, de ahora en adelante "kit de la invención", que comprende los medios adecuados para llevar a cabo el método de la invención. En una realización preferida, el kit de la invención comprende: sondas PNA, sondas CEP y sondas Taqman que son específicas para los genes SCIN, AKAP9, EDN-1, CXCL1, CXCL12 y CD70. En una realización más preferente, las sondas CEP son específicas de los cromosomas 8, 10, 11 y/o 17.
- 10 Se entiende por "sondas PNA" las sondas teloméricas de ácido nucleico peptídico LL(CCCTAA)₃ marcadas con, por ejemplo, pero sin limitarse a, Cy3. Son sondas híbridas de ácido nucleico y proteínas, diseñadas para la detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos. Su estructura está formada por una cadena de aminoácidos que forman la cadena principal a la cual se unen las bases nitrogenadas. Estas sondas podrían ser utilizadas en, pero sin limitarse a, técnicas de FISH o FISH-Q cuantitativas.
- 15 Las sondas Taqman específicas de los genes SCIN, AKAP9, EDN-1, CXCL1, CXCL12 y CD70 son las que se detallan en la tabla 1 de los ejemplos de la presente invención u otras homólogas.

Una realización preferida del kit de identificación de células madre mesenquimales senescentes además comprende sondas PNA, sondas CEP y sondas Taqman específicas para los genes HIST1 H4C, HIST1 H4L, HIST1 H1C, CENPM, DYNLT3, SPC25, GTSE1, CDC45L, PLK1 y SKA3.

- 20 Este kit puede comprender, sin ningún tipo de limitación, medios de cultivo, tampones, reactivos y agentes para prevenir la contaminación. Puede comprender, además, cebadores, sondas, fluorocromos, polimerasas, anticuerpos, reactivos, etc. Además el kit puede incluir métodos y medios necesarios para llevar a cabo la extracción, purificación, etc. de ácidos nucleicos y/o proteínas. También puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo el método de la invención. A título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, el kit contendrá elementos necesarios para la identificación de células madre mesenquimales senescentes mediante la técnica que se ha descrito anteriormente.
- 25
- A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no excluye otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.
- 30

Descripción de las figuras

- 35 Fig. 1. A) Muestra el análisis de la longitud telomérica de las MSCs por Q-FISH en MSCs en interfase de los pases 2 y 15 frente a la duplicación poblacional. Las líneas de puntos representan el acortamiento de los telómeros de las MSCs que se cultivan en 3% de O₂. Las líneas continuas representan el acortamiento de los telómeros de las MSCs que se cultivan en 20% de O₂. B) Muestra la cuantificación de la pérdida de la longitud telomérica en Kb por duplicación poblacional. La conversión de fluorescencia de los telómeros a Kb se lleva a cabo utilizando las líneas fibroblásticas TIN2 y TIN2-13. La pérdida de longitud telomérica fue de menos del 24% en 3% O₂ que en 20% de O₂ (p=0,015). C-D) muestra ejemplos de MSCs (C) en metafase y de células inmortalizadas hTert (D) hibridadas con sondas PNA teloméricas (señales brillantes al final de los cromosomas y contratiñencia con DAPI).
- 40

La Fig. 2. Muestra el incremento en los niveles de aneuploidia con la duplicación de la población celular.

- 45 La Fig. 3. Muestra los niveles de aneuploidia en los distintos pases de MSCs, bajo condiciones de 20% y de 3% de O₂, y dos líneas hTert independientes en el pase 22 (P22), bajo condiciones de 20% de O₂. Determinación por FISH con sondas centroméricas para los cromosomas 8, 13 y 17. Las células no senescentes (3% O₂) tienen reducido su nivel de aneuploidia de manera significativa (p<0,05) desde el pase 2 en adelante.

La Fig. 4. Muestra el porcentaje de células aneuploides que presentan una o más copias extras de los cromosomas 8, 11 y 17 en diferentes pases de cultivo. En ninguno de los pases (P2-P20), ninguno de los cromosomas muestra diferencias significativas en el porcentaje de aneuploidia respecto a los otros cromosomas.

- 50 La Fig. 5. a) muestra el porcentaje de células aneuploides con un número de copias superior a 2 para los cromosomas 8, 10, 11 y 17, en pase tardío (P20) de 4 líneas independientes de hMSCs. b) muestra el porcentaje medio de células aneuploides con número de copias superior a 2 de las 4 líneas de hMSCs en el pase 20.

Aproximadamente el 80% de las hMSCs en pase tardío mantienen una copia extra del cromosoma 10 (*=valor $p < 0,002$) y sólo el 20% de las hMSCs en pase tardío presentan copias extras de los otros cromosomas.

5 La Fig. 6. Muestra la cuantificación de los transcritos de ARNm de escinderina (scin), endotelina-1 (edn-1), proteína de anclaje quinasa A 9 (AKP9; Yotiao), cd70, ligando 1 de quimiocina (C-X-C) (Gro-alpha) y ligando 12 de quimiocina (Factor derivado del estroma-1) por RT-PCR utilizando un ensayo Taqman en MSCs en el pase 2 (P2) frente al pase 21 (P21). Las barras representan las veces que están cambiados estos genes en cuatro líneas celulares independientes.

10 La Fig. 7. Muestra anafases multipolares en MSCs que se cultivan en 20% de O_2 . Se observan husos mitóticos aberrantes con múltiples polos, que pueden verse gracias a la tinción con alfa-tubulina (paneles de la derecha), y con alineamientos cromosómicos anormales (paneles de la izquierda), y tinción con DAPI, en estas mismas células. Ejemplos de células en anafase normal con dos polos mitóticos normales en MSCs que se cultivan en 3% de O_2 .

La Fig. 8. Muestra la cuantificación del porcentaje de husos aberrantes en 40-50 células analizadas por línea celular ($n=4$) y concentraciones de O_2 de las MSCs en el pase 20.

La Fig. 9. Muestra resultados de la citometría de flujo.

15 Se muestran los parámetros de tamaño (FSC) y complejidad (SSC) para 4 líneas independientes de hMSC en pase temprano (arriba) y pase tardío (abajo), mostrando un incremento del tamaño y complejidad de las células con la senescencia.

La Fig. 10. Muestra cambios en el tamaño celular, senescencia y el incremento de inestabilidad genética.

20 a) Ejemplo de Citometría de flujo que muestra los parámetros de tamaño (FSC) y complejidad (SSC) de una línea de hMSC en pase temprano (p7) y pase tardío (p18). b) Selección de hMSC por Citometría de flujo en pase medio, seleccionando células grandes y complejas contra pequeñas y menos complejas. c) curva de crecimiento de las dos sub-poblaciones celulares, que muestran que las células grandes no crecen en cultivo y tienden a ser más senescentes que sus homologas pequeñas. d) porcentaje de células aneuploides para cualquiera de los 3 cromosomas 8, 11 y 17; casi un 60% de las células grandes y solo un 25% de las células pequeñas son aneuploides. e) cuantificación relativa de la longitud telomérica de las dos sub-poblaciones que muestra que las células grandes poseen los telómeros más cortos confirmando la hipótesis de que estas células son más senescentes.

Ejemplos

30 A continuación se ilustra la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad del método de identificación de células madre mesenquimales senescentes. Estos ejemplos específicos sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención y se incluyen solamente con fines ilustrativos, por lo que no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos a continuación ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

Ejemplo 1. Células y condiciones de cultivo.

35 Las células madre mesenquimales humanas fueron obtenidas del Inbiobank Stem Cell Bank (www.inbiobank.org) y procedían del tejido adiposo. Estas células mostraron el fenotipo CD29+, CD73+ (SH3 y SH4), CD105+ (SH2), CD166+, CD45- y CD31-. Todos los donadores de las células se sometieron a pruebas para VIH-1, VIH-2, hepatitis B y C y micoplasma. El proceso de extracción celular se desarrolla a partir de lipoaspirados y las células se trataron a continuación con colagenasa.

40 Las MSCs ($1-2 \times 10^4$ células/ml) se cultivaron en un medio rico en glucosa, un medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma, EEUU), complementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Sigma, EEUU), glutamina y penicilina/estreptomicina. Las células se cultivaron en presencia de dos concentraciones de O_2 diferentes, en 20% y en 3%, para así obtener una población celular senescente y otra no senescente, respectivamente, que pudieran ser comparadas. Aquellas células capaces de adherirse a la placa se consideran el primer extracto de hMSC derivado de tejido adiposo. El medio se cambió dos veces por semana y las células se pasaron una vez cada siete días hasta llegar a una confluencia aproximada del 80%. El crecimiento celular *in vitro* fue monitoreado y se contó el número de células con un hemocitómetro.

Ejemplo 2. Medición del acortamiento de los telómeros de las células madre mesenquimales humanas que se cultivan *in vitro*.

50 2.1. Ensayo de la longitud de los telómeros

Para determinar si la senescencia en las células madre mesenquimales humanas es debida a un acortamiento de los telómeros, se lleva a cabo una hibridación *in situ* fluorescente cuantitativa (Q-FISH) utilizando una sonda telomérica PNA (ácido nucleico peptídico) LL(CCCTAA)₃ marcada con Cy3 (Eurogentec) en el núcleo de las MSCs en cuatro líneas diferentes en interfase, que se cultivan en 20% de O₂ y 3% de O₂ en fase 2 y en el fase 15 (ver Fig. 1 A). Después de la hibridación las células se lavan tres veces en 0,1% de PBS Tween durante 10 minutos a 60°C y se deshidratan en etanol durante 5 minutos. Finalmente, se realiza una tinción de contraste en medio de montaje con DAPI Vectashield (Vector Laboratories, Inc). Las imágenes se toman con CytoVision. Las señales de los telómeros se capturan en el mismo tiempo de exposición en todas las muestras. La longitud de los telómeros en Kb se calcula en función de la fluorescencia de los fibroblastos 82-6 inmortalizados con hTert que expresan las proteínas TIN2 y TIN2-13 con longitudes teloméricas estables y conocidas (3,4 y 8,4 Kb respectivamente). Las señales de los telómeros de al menos 20-30 núcleos por grupo se cuantifican usando TFL-Telo versión 2.

En las células que se cultivan en 20% de O₂ la media de la longitud telomérica en el fase 2 y en el fase 15 es de 8,43 ± 1,28 Kb y 3,76 ± 0,7 Kb, respectivamente. Las mismas células en 3% de O₂ de los mismos pases presentan una media de la longitud telomérica de 8,21 ± 1,1 Kb y 5,04 ± 0,95 Kb, respectivamente, lo que indica que las células que se cultivan bajo condiciones de estrés oxidativo (20% O₂) acortan su ADN telomérico en un grado mucho más elevado que las células cultivadas en 3% de O₂ (ver Fig. 1B). Esto demuestra que el ratio de acortamiento de los telómeros es 378 ± 46 y 470 ± 61 pares de bases por división celular en 3% de O₂ y en 20% de O₂, respectivamente. Este experimento sugiere que el crecimiento de las MSCs depende del mantenimiento de los telómeros.

2.2. Ensayo de la actividad de la telomerasa

Ya que la longitud de los telómeros se encuentra fuertemente influenciada por la telomerasa, se analizan los niveles de la actividad de esta enzima utilizando un ensayo TRAP basado en Q-PCR. El ensayo de la telomerasa se lleva a cabo en células madre mesenquimales y en fibroblastos, los cuales se consideran negativos a telomerasa. Se emplean 5.000 MSCs por ensayo: se añaden 2 µl del reactivo de extensión a 23 µl de mezcla de reactivo para PCR que contiene (1 x PCR Master Mix power SYBR Green, 5mM EGTA, 4ng/µl Oligo ACX, 2ng/µl Oligo TS). La PCR se lleva a cabo en 40 ciclos a 94°C durante 10 minutos, a 94°C durante 15 segundos y a 60°C durante 1 minuto. La PCR se continúa mediante el sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7700 (Applied Biosystem) y el análisis se lleva a cabo utilizando el software 7900HT v2.3 (Applied Biosystem).

Se observa que las células madre mesenquimales primarias poseen un nivel equivalente de actividad de la telomerasa equivalente al de los fibroblastos primarios que normalmente se consideran negativos a telomerasa. Aunque en ambos casos, sin embargo, se detectan bajos niveles de actividad de la telomerasa gracias a la sensibilidad del método.

Para confirmar que la senescencia de las MSCs depende de la actividad de la telomerasa y de la longitud de los telómeros, las MSCs primarias del fase 5 se incuban con un lentivirus (pRRL.SIN18) que codifica para la subunidad catalítica de la transcriptasa inversa de la telomerasa humana (hTert). Para comprobar la expresión de la telomerasa tras la infección, se llevan a cabo ensayos TRAP.

Se observa que las MSCs infectadas con lenti-hTert se immortalizan, libres de senescencia y alargan sus telómeros dos o tres veces (ver Fig. 1 C-D).

Estos resultados indican que la senescencia de las MSC humanas derivadas del tejido adiposo es dependiente del acortamiento de los telómeros y que además la infección de la subunidad catalítica de la telomerasa humana es suficiente para immortalizar este tipo celular.

Ejemplo 3. Análisis del nivel de ploidía de las células madre mesenquimales humanas.

Se determinaron los niveles de ploidía en MSCs en interfase en ambas condiciones de cultivo en los pases 2 a 15 mediante FISH con sondas centroméricas para los cromosomas 8, 11 y 17 (ver Fig. 2 y 3), con concentraciones de oxígeno diferentes. Se incubaron células con 10 µg/ml de Colcemida durante 4 horas a 37°C, se trataron con 0,56% de KCl durante 15 minutos a 37 °C y se fijaron en metanol: ácido acético (3:1) tres veces. Las suspensiones celulares se depositaron en portaobjetos y se secaron al aire durante 24 horas. Antes de la hibridación, los portaobjetos se trataron con solución de proteasa (0,1% Pepsina y HCl) y se fijaron en 4% formaldehído durante 5 minutos a temperatura ambiente; posteriormente se deshidrataron mediante incubaciones seriadas a concentraciones crecientes de etanol (70, 90 y 100%) durante 5 minutos cada una. Las células se desnaturalizaron en 70% de formamida desionizada y 2X SSC durante 5 minutos a 73 °C. Seguidamente se deshidrataron como se ha descrito anteriormente. Tras la deshidratación, las células se incubaron durante 24h a 37 °C en oscuridad, con 2-3 µl de sondas comerciales específicas de regiones CEP y LS1 de los centrómeros de los cromosomas 8, 10, 11 y 17 (kit comercial *Breast Aneusomy Multi-Color Probe*-<http://www.abbottmolecular.com>). Las células se lavaron en dos pasos con 0,4XSSC/0,3% NP40 durante 2 minutos a 73 °C y 2XSSC/0,1% NP40 durante 1 minuto a temperatura ambiente; tras los lavados se colorearon los cromosomas utilizando medio de montaje vectashield

(laboratorios VECTOR) con DAPI (4,6-diamidino-2 fenilindol). Son captados entre 100 y 200 núcleos por línea celular y pase y se cuenta individualmente para cada núcleo el número de copias de cada uno de los cromosomas. Los datos se analizan estadísticamente mediante el método de *t de student* utilizando las 5 líneas celulares. Las señales se tomaron con un microscopio Nikon 90i que posee una lente 100X plan fluor [1,3 N/A] y filtros apropiados. Las imágenes digitales se toman mediante el software Genus (Cytovision).

Tras investigar la presencia de aneuploidias cromosómicas en interfase en 4 líneas de hMSCs independientes utilizando sondas específicas para estos tres cromosomas diferentes (8, 11 y 17), se comprueba que durante el cultivo celular prolongado se produce un aumento progresivo de los niveles de aneuploidia para estos tres cromosomas (preferentemente hacia un aumento en el número de copias), sin presentar diferencias significativas en el porcentaje de aneuploidias entre cromosomas (ver Fig. 4). Se observó que incluso en pases tempranos los niveles de aneuploidia para cualquiera de estos cromosomas son del 15%. Los resultados indicaron que existe una tendencia a incrementar la aneuploidia con el incremento de los pases del cultivo bajo ambas concentraciones de O₂, alcanzando el 35% en el pase 15 (ver Fig. 3).

Se analizan los niveles de aneuploidia cromosómica para otros cromosomas en células que han sido cultivadas hasta alcanzar la senescencia. De este modo, se observó que un alto porcentaje de células en interfase en el pase 20 presentaba copias extras del cromosoma 10 en comparación con los otros cromosomas analizados (ver Fig. 5 a), alcanzando niveles próximos al 80% de células con copias extras para el cromosoma 10 en comparación con porcentajes cercanos al 20% para los otros 3 cromosomas (valor p<0,002) (ver Fig. 5 b). Estas observaciones citogenéticas indican: 1) que copias extras del cromosoma 10 están asociadas a la senescencia de las hMSCs y 2) que la adquisición de copias extras para el cromosoma 10 está proporcionando a estas células una ventaja selectiva en estas condiciones de cultivo. Por lo tanto, se propone que el cromosoma 10 puede ser utilizado como un biomarcador de senescencia y de inestabilidad genética de las células hMSCs.

Un posible factor inductor de la aneuploidia es el acortamiento de los telómeros. Para medir si este acortamiento es el responsable de la aneuploidia observada en las MSCs, se miden los niveles de aneuploidia de las células inmortalizadas hTert-MSCs que se cultivan en 20% de O₂. Estas células en el pase 22 muestran 19,48% y 13,70% de aneuploidia (ver Fig. 3), lo cual es similar al nivel de aneuploidia del pase 2 de las MSC, lo que indica que el acortamiento de los telómeros es un factor importante que induce aneuploidia.

Ejemplo 4. Perfil de expresión génica de pases tardíos de cultivos de células madre mesenquimales humanas: desregulación de los genes que controlan el nivel de ploidía.

Para buscar posibles biomarcadores de inestabilidad genética y descubrir los mecanismos que juegan un papel importante en la senescencia de las MSCs humanas, se lleva a cabo un análisis de la expresión génica de las MSC que se cultivan en el pase 2 (n=4) y en el pase 21 (n=4) en 20 % de O₂. Se emplea el protocolo de análisis de la expresión génica basado en micromatrices de un único color (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EEUU) para amplificar y marcar el ARN. Se realiza una retrotranscripción de 400 ng del ARN total mediante el cebador promotor T7 y MMLV-RT. El ADNc se convierte a ARNa utilizando la ARN polimerasa T7, que amplifica el material diana e incorpora simultáneamente CTP marcado con cianina 3. Las muestras se hibridan a la micromatriz de todo el genoma humano 4 x 44K (G4112F, Agilent Technologies). Se hibridan 1,65 µg del ARNa marcado con Cy3 durante 17 horas a 65 °C en un set de hibridación en horno (G2545A, Agilent) a 10 rpm en una concentración final de 1X GEx de tampón de hibridación HI-RPM. Las matrices se lavan y se secan por centrifugación. Se escanean a una resolución de 5 mm en un escáner de alineamiento de micromatrices de ADN (G2565BA, Agilent Technologies). Las imágenes aportadas por el escáner se analizan utilizando el software de extracción de rasgos (Feature Extraction, Agilent Technologies).

Los datos de la extracción de características se importan al software GeneSpring® GX versión 9.0. (Agilent Technologies). Se cuantifican los valores de la normalización y de la expresión (log2 transformado) para cada sonda. Las sondas también se marcaron (presente, marginal, ausente) mediante GeneSpring®. Se seleccionan para análisis posteriores aquellas sondas en las que los valores de las señales se encuentran por encima del percentil más bajo (20) y marcadas como presente o marginal en el 100% de las replicaciones, en al menos una de las dos condiciones en estudio (23.716 sondas).

El análisis estadístico de la expresión génica diferencial entre el pase 21 y el pase 2 se realizó mediante un test SAM pareado de dos clases (Tusher, et al., 2001. Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 98, 5116-5121 (2001)).

Se utiliza un análisis de enriquecimiento génico y vías de señalización utilizando el software *Ingenuity Pathway Analysis* (Ingenuity Systems®) para generar una red de interacción entre los genes de interés y para el análisis funcional de los genes específicos, y así analizar qué procesos o vías de señalización están implicados en la inestabilidad genética.

El ARN de las MSCs se extrae utilizando el método estándar TRIzol y la reacción de retrotranscripción se lleva a cabo mediante el kit de transcriptasa inversa SuperScript III (Invitrogen). Se añade (10 ng) de ADNc para reacción a 10 μ l de 2x PCR Master Mix (Applied Biosystems). Las sondas Taqman que se han empleado en los ensayos de expresión génica para la cuantificación del ARNm son las que se describen a continuación en la tabla 1 (*Applied Biosystems*):

Tabla 1. Sondas Taqman empleadas para la cuantificación del ARNm de los genes empleados como biomarcadores de senescencia.

CXCL1	Hs00605382_gH
SCIN	Hs00263961_m1
CXCL12	Hs00171022_m1
EDN1	Hs01115919_m1
AKAP9	Hs00323978_m1
CD70	Hs00174297_m1

La PCR se cargó en un aparato ABI PRISM 7700 y se cuantificó utilizando el software 7900HT v2.3 (*Applied Biosystem*).

Estos análisis indicaron que las células de los pases avanzados del cultivo tienen sobreexpresados 23 genes y reducida la expresión de 17 genes, q (%) < 15%. El análisis funcional muestra que existen 69 genes asociados a procesos de cáncer y del ciclo celular que están significativamente modificados ($p \leq 0,02$) en los datos de expresión génica. En la categoría de ciclo celular y cáncer, se observó que 8 genes estaban significativamente modificados (FDR < 12%) (Tabla 2). De estos, 5 codifican para proteínas que están implicadas en ploidía y poliploidización: escinderina (SCIN), proteína de anclaje quinasa A 9 (AKAP9; Yotiao) y Endotelina-1 (EDN-1), que fueron sobreexpresadas 12,31, 2,36 y 1,89 veces, respectivamente, y CXCL12 y CXCL1 que presentaron una expresión reducida en 7,14 y 11 veces, respectivamente (Tabla 2). Para verificar el análisis de expresión génica y el análisis de las vías de señalización se realiza una RT-PCR para la expresión de los genes SCIN, AKAP9, EDN1, CXCL1, CXCL12 y CD70 en MSCs en el pase 2 y en el pase 21, y se observa un aumento significativo en la expresión de SCIN, AKAP9, EDN1 ($p < 0,05$), una reducción significativa en la expresión de CXCL1 y CD70 ($p < 0,05$) y una ligera reducción en la expresión de CXCL12 ($p = 0,09$) (ver Fig. 6).

Tabla 2. Resultados del análisis de expresión génica de las MSCs en el pase 21 en comparación con las células del pase 2. Sólo están representados aquellos genes que se identifican con el análisis con *Ingenuity Pathway Analysis* como expresados de manera significativamente diferencial ($p < 0,02$) en los dos grupos, y que están implicados en el ciclo celular y en el control de la ploidía.

Gen	Descripción	Nº Veces que está alterado	LOG de veces que está alterado	Valor q (%)
SCIN	escinderina (SCIN)	12,31	3,62	2,95
ACVR1C	receptor de activina A, tipo IC	2,94	1,56	2,95
AKAP9	quinasa A (PRKA) proteína de anclaje (yotiao) 9	2,36	1,24	11,50
EDN1	endotelina 1 (EDN1)	1,89	0,92	5,03
CXCL2	chemokina (C-X-C) ligando 2	0,19	-2,39	4,61
CXCL12	ARNm de la proteína FLJ00404	0,14	-2,86	3,69
CD70	molécula CD70 (CD70)	0,10	-3,36	3,69
CXCL1	chemokina (C-X-C) ligando 1	0,09	-3,45	0,00

Como los resultados del FISH mostraron que las MSCs que se cultivan en 20% de O_2 sufren un aumento significativo en la aneuploidia, en comparación con las mismas células que se cultivan en 3% de O_2 , se investigó si algunos de los genes identificados mediante el análisis de la expresión génica y el análisis de las vías de

señalización cambiaron su expresión de acuerdo con la concentración de O₂. Por tanto, en las células que se cultivan en presencia de 20% de O₂ hay un incremento en la expresión de SCIN, EDN-1 y AKAP9 y una reducción en la expresión de CXCL12. Esta expresión diferencial demuestra el potencial de estos genes para ser utilizados como biomarcadores de la estabilidad genética y de la senescencia en MSCs.

- 5 Ejemplo 5. Análisis de los efectos de la expansión *in vitro* sobre el huso mitótico de células madre mesenquimales humanas que se cultivan a 20% de O₂.

Los resultados de expresión génica sugieren que además del acortamiento de los telómeros, los defectos en el huso mitótico podrían estar implicados en la generación de aneuploidia en las MSCs. A la luz de esta posibilidad, se determinó el porcentaje de polos en los husos mitóticos de las MSCs. Las MSCs que se cultivan en 20% de O₂ y 3% de O₂ de los pases 18 a 20 se sembraron en cubreobjetos de cristal y se trataron con 0,1% de gelatina. Los cubreobjetos se lavaron dos veces en PBS, se fijaron en 4% de paraformaldehído en PBS durante 15 minutos, se permeabilizaron en 0,25% Triton X-100 en PBS durante 10 minutos y se bloquearon en 0,1% Tween, 1% BSA en PBS durante 1 hora. Los cubreobjetos se incubaron con un anticuerpo anti-alfa tubulina (CP06 Calbiochem) (1:100) durante 1 hora. La detección se llevó a cabo con una dilución 1:200 del anticuerpo secundario conjugado de cabra anti ratón Alexa Fluor-488 (ver Fig. 7). Se analizaron 32-49 células mitóticas por línea celular en 4 aislados independientes en cada concentración de oxígeno. Todas las líneas celulares se analizaron en el pase 20 ± 2.

Este análisis indica que las MSCs que se cultivan en 20% O₂ durante 18-20 pases presentaron una media de mitosis multipolar de 9,7 ± 0,29 %, mientras que las mismas células que se cultivan en 3% de O₂ solo mostraron un 3,4 ± 0,18% de defectos por huso (ver figura 8). Esto indica que las células senescentes presentan un número de mitosis multipolares más elevado que el que presentan las células no senescentes.

- 20 Ejemplo 6. Nuevo análisis estadístico de la matriz de expresión.

El marcado de las muestras y la hibridación de la micromatriz, así como la extracción de datos, se llevó a cabo tal como se ha descrito en el ejemplo 4. Los datos obtenidos fueron editados en R.

6.1 Marcado de muestras e hibridación de micromatrices

25 La micromatriz de un color basada en el protocolo para el análisis de expresión de genes de Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) fue utilizado para amplificar y marcar el ARN. En resumen, 400 ng de ARN total fue retro-transcrito utilizando el cebador promotor T7 y MMLV-RT. El cADN fue entonces convertido a aARN utilizando la polimerasa ARN T7, la cual simultáneamente amplifica el material diana e incorpora cianina 3 marcada CTP. El ARN marcado con Cy3 (1,65 µg) fue hibridado a una micromatriz de genoma humano completo 4 x 44K (G4112F, Agilent Technologies) durante 17 horas a 65 °C en tampón de hibridación HI-RPM 1X GEx en un horno de hibridación (G2545A, Agilent Technologies) a 10 rpm. Las matrices fueron lavados de acuerdo a las instrucciones, secados, centrifugados y escaneados a 5 mm de resolución en un escáner de micromatrices de ADN (G2565BA, Agilent Technologies) con las correcciones de defectos en el formato del micromatriz 4x44K de un color. El escaneo de las imágenes fue analizado utilizando el software adecuado (Agilent Technologies).

35 6.2 Procesamiento de datos

Los datos fueron leídos en R y procesados utilizando el paquete Bioconductor Agi4x44PreProcess de la siguiente manera: Las opciones del Agi4x44PreProcess eran listas con el MeanSignal y el BGMedianSignal como señales de primer plano y de fondo respectivamente. A continuación, los datos fueron corregidos y normalizados según el fondo de la matriz utilizando los métodos de la media y el cuantil. El método de la media produjo un fondo positivo con señal corregida por sustracción de la señal del fondo desde la señal del primer plano de mantenimiento de cualquier intensidad inferior o igual a 0,5 para producir intensidades corregidas positivas. Entonces, los datos fueron normalizados entre las matrices utilizando el método del cuantil (Bolstad et al., 2003. Bioinformatics. Vol. 19, 185-193). Una constante de 50 fue añadida a la intensidad antes de la transformación logarítmica con la intención de reducir la variabilidad de la señal de las bajas intensidades de expresión de los genes. El software de análisis de imágenes AFE añade a cada característica un conjunto de indicadores que identifican diferentes propiedades de cuantificación de la señal. El Agi4x44PreProcess utiliza estos indicadores para filtrar las características que 1) son controles 2) están fuera del rango dinámico del escáner y 3) son valores atípicos. Para mantener las características dentro del rango dinámico, se pueden aplicar 3 niveles de filtrado independientes, asegurando de ese modo que 1) la señal se distinga del fondo, 2) que la señal sea encontrada y 3) que la señal no esté saturada.

50 Para cada uno de esos pases de filtrado, fue necesario que cada característica tuviera al menos un 75% de sus réplicas dentro de una condición experimental y que tuviera una cuantificación de la señal que indicase que la señal estaba dentro del rango dinámico. Además, para cada característica de las réplicas a lo largo de todo el conjunto de muestras, se filtraron aquellas sondas que tenían más del 25% de estas réplicas en al menos una condición experimental con una señal que indicaba la presencia de valores atípicos. Después de la finalización de todos los

pasos de pre-procesamiento, se obtuvieron 26.670 (p21 contra p2) características disponibles para el análisis estadístico. Finalmente, Agi4x44PreProcess mapeó cada sonda de Agilent correspondiente al número de acceso, símbolo del gen, descripción del gen e identificadores de ontología génica (GO) (Consortio de Ontología Génica) utilizando las anotaciones proporcionadas por el Bioconductor *hgug4112a.db*.

5 6.3 Análisis estadístico

El análisis de expresión diferencial se realizó utilizando las características de modelado lineal empleadas en el paquete del Bioconductor limma. El paquete limma incorpora métodos de Bayes empíricos (Smyth, 2004. Stat Appl Genet Mol Biol. Vol. 3, Artículo 3) para obtener la estadística moderada. Para calcular la expresión diferencial entre las diferentes condiciones experimentales en el conjunto de datos (P21 contra P2), el siguiente modelado lineal fue aplicado a cada gen:

$$y_{ij} = \tau_i + e_{ij}$$

Donde, y_{ij} es la observación del tratamiento ith para individuales jth, τ_i es el efecto de la ith tratamiento y e_{ij} es el error experimental, suponiendo una distribución normal con 0 de media y varianza σ_e^2 . Los genes que están diferencialmente expresados debido a las diferencias en los tratamientos se determinaron comparando cada gen de la hipótesis de no diferencias entre señales de genes bajo diferentes tratamientos utilizando la estimación $\hat{\tau}_i$.

Para reducir el número de genes para la corrección de las comprobaciones múltiples. Sin pérdida de información relevante, se realizó un filtrado no específico descartando los genes que mostraban una expresión constante entre las muestras (IQR<0,50) o baja expresión de la señal (\log_2 expression < 5 en todas las muestras) utilizando la función Bioconductor *genefilter*. La comparación múltiple de genes se realizó teniendo en cuenta la tasa de determinaciones falsas, la cual se estimó mediante el valor del estadístico q (Storey and Tibshirani, 2003. Proc Natl Acad Sci USA., Vol. 100, 9440-9445) utilizando el valor q Bioconductor.

Para integrar los perfiles de expresión significativa en las categorías funcionales, se realizó una ontología de genes (GO) basada en el análisis estadístico utilizando la función hyperGTest del paquete GOstats. El hyperGTest calcula los valores de p hipergeométricos para comprobar la sobrerrepresentación y la sub-representación de cada término GO en un subconjunto dado de genes, contra la distribución de términos GO definidos en un universo de genes. El universo incluye aquellos genes que están por encima de la señal de fondo y tienen un conocido término GO en la correspondiente base de datos. Los genes duplicados fueron eliminados antes del análisis GO.

6.4. Resultados obtenidos. Biomarcadores seleccionados

6.4.1. Biomarcadores relacionados con la estabilidad genética.

Los genes seleccionados por su desregulación diferencial son genes que codifican para histonas y para la proteína HMGA1. La siguiente tabla muestra que hay un patrón claro en el aumento de la expresión de todas las histonas de la familia 2HB y una disminución en la expresión de las histonas de la familia H4. El resto de histonas presentan cambios sin ningún patrón claro.

Tabla 3. Conjunto de genes de Histonas y HGMA1

SIMBOLO	NOMBRE	Cambio (Log2)	FDR BH (t)	FDR valor q (t)
HIST2H2AC	Grupo de histonas 2, H2ac	-0.744	0.06824	0.0346
HIST1H4C	Grupo de histonas 1, H4c	-1.025	0.06824	0.0346
HIST1H2BK	Grupo de histonas 1, H2bk	0.994	0.06824	0.0346
HIST1H4L	Grupo de histonas 1, H4l	-1.05	0.06824	0.0346
HIST1H2BE	Grupo de histonas 1, H2be	0.872	0.06824	0.0346

Tabla 3 (continuación)

SIMBOLO	NOMBRE	Cambio (Log2)	FDR BH (t)	FDR valor q (t)
HIST1H4B	Grupo de histonas 1, H4b	-0.977	0.06824	0.0346
HIST1H2BO	Grupo de histonas 1, H2bo	0.963	0.06824	0.0346
HIST1H4D	Grupo de histonas 1, H4d	-0.999	0.0684	0.03468
HIST1H2BL	Grupo de histonas 1, H2bl	0.897	0.0684	0.03468
HIST1H2BF	Grupo de histonas 1, H2bf	0.882	0.0684	0.03468
HIST1H2BH	Grupo de histonas 1, H2bh	0.91	0.07012	0.03555
HIST1H3D	Grupo de histonas 1, H3d	0.785	0.0728	0.03691
HIST1H1A	Grupo de histonas 1, H1a	-0.876	0.07288	0.03695
HIST1H2BI	Grupo de histonas 1, H2bi	0.79	0.07288	0.03695
HIST1H1B	Grupo de histonas 1, H1b	-0.623	0.07445	0.03775
HIST1H2BB	Grupo de histonas 1, H2bb	0.816	0.07445	0.03775
HIST1H2AE	Grupo de histonas 1, H2ae	0.84	0.07445	0.03775
HMGA1	Grupo de alta movilidad AT-hook 1	-0.738	0.07744	0.03926
HIST1H2BC	Grupo de histonas 1, H2bc	0.833	0.07744	0.03926
HIST1H1C	Grupo de histonas 1, H1c	1.433	0.07744	0.03926
HIST1H2BD	Grupo de histonas 1, H2bd	0.721	0.08786	0.04455
HIST1H2BM	Grupo de histonas 1, H2bm	0.666	0.08786	0.04455
HIST1H2BJ	Grupo de histonas 1, H2bj	0.784	0.08786	0.04455
HIST1H2BN	Grupo de histonas 1, H2bn	0.747	0.08886	0.04506
HIST2H2AA4	Grupo de histonas 2, H2aa4	0.947	0.09486	0.0481
HIST2H2BE	Grupo de histonas 2, H2be	0.692	0.09507	0.04821
HIST1H2AD	Grupo de histonas 1, H2ad	0.87	0.09507	0.04821

6.4.2. Biomarcadores relacionados con la estabilidad genética y más concretamente con la segregación cromosómica durante la mitosis.

- 5 La segregación cromosómica durante la mitosis es una de las causas más importantes de la estabilidad genética. Se seleccionaron aquellos marcadores que tenían un valor $p \leq 0,05$. Los genes marcadores se muestran en la siguiente tabla. Muestra que la expresión de todos los genes que codifican para las proteínas del complejo asociado al centrómero (CENP) se redujo excepto en un caso.

Tabla 4. Genes del complejo asociado al nucleosoma centromérico (CENP-A NAC).

SIMBOLO	NOMBRE	Cambio (Log2)	FDR BH (t)	FDR valor q (t)
CENPM	Proteína del Centromero M	-1.251	0.07744	0.03926
CENPO	Proteína del Centromero O	-0.52	0.11434	0.05798

Tabla 4 (continuación)

SIMBOLO	NOMBRE	Cambio (Log2)	FDR BH (t)	FDR valor q (t)
CENPA	Proteína del Centromero A	-0.703	0.12857	0.06519
CENPN	Proteína del Centromero N	-0.205	0.31661	0.16054 ⁵
CENPV	Proteína del Centromero V	-0.269	0.37008	0.18765
CENPK	Proteína del Centromero K	-0.213	0.54428	0.27597
CENPF	Proteína del Centromero F, 350/400ka (mitosina)	-0.51	0.61506	0.31186
CENPQ	Proteína del Centromero Q	0.079	0.76654	0.38867

10 6.4.3. Biomarcadores relacionados con la estabilidad del centrosoma, centrómero y cinetocoro. (huso mitótico)

La estabilidad del centrosoma, centrómero y cinetocoro son sub-funciones que afectan a la segregación cromosómica. La tabla 6 muestra que, de todos los marcadores seleccionados (26), la mayoría (21) mostraron una expresión reducida.

Tabla 5. Genes del Huso Mitótico

SIMBOLO	NOMBRE	Cambio (Log2)	FDR BH (t)	FDR valor q (t)
DYNLT3	Dineína, cadena ligera, tipo Tctex-3	1.07	0.06824	0.0346
SPC25	SPC25, NDC80 componente del complejo del cinetocoro, homólogo (<i>S. cerevisiae</i>)	-1.466	0.07207	0.03654
TNFAIP3	Factor de necrosis tumoral, alpha-proteína inductora 3	-0.988	0.07445	0.03775
GTSE1	G-2 and S-fase expresado 1	-1.569	0.07677	0.03892 ²⁰
HAUS8	HAUS complejos similares a augmin, subunidad 8	-0.643	0.07677	0.03892
CDC45L	CDC45 división del ciclo celular similar a 45 (<i>S. cerevisiae</i>)	-1.832	0.07677	0.03892
SKA1	Subunidad 1 del Complejo asociado al huso y cinetocoro	-0.79	0.07744	0.03926
PLK1	Polo similar a quinasa 1 (<i>Drosophila</i>)	-1.748	0.07744	0.03926 ²⁵
sep-07	Septina 7	0.848	0.08471	0.04295
CEP63	Proteína centrosomal 63kDa	0.545	0.08786	0.04455
SKA3	Subunidad 3 del Complejo asociado al huso y cinetocoro	-1.263	0.09507	0.04821
KIF22	Quinesina miembro de la familia 22	-0.909	0.09507	0.04821
ESPL1	Cuerpo extra 1 homólogo al polo del huso (<i>S. cerevisiae</i>)	-0.935	0.09622	0.04879
PXN	Paxillina	-0.793	0.09916	0.05028 ²⁸

Tabla 5 (continuación)

SIMBOLO	NOMBRE	Cambio (Log2)	FDR BH (t)	FDR valor q (t)
BIRC5	Baculoviral IAP conteniendo repeticiones 5	-1.415	0.10174	0.05159
BUB1B	Ciernes desinhibida por benzimidazoles homólogo beta 1	-1.17	0.10174	0.05159
CEP290	Proteína centrosomal 290kDa	0.965	0.10174	0.05159
CCNB1	Ciclina B1	-0.978	0.10196	0.0517
KIFC1	Quinesina miembro de la familia C1	-1.61	0.10218	0.05181
SPAG5	Antígeno asociado a esperma 5	-1.418	0.10245	0.05195
NDC80	NDC80 homologo, componente del complejo del cinetocoro (<i>S. cerevisiae</i>)	-1.242	0.10412	0.05279
HAUS7	HAUS similar a complejo augmin, subunidad 7	-0.562	0.1057	0.0536
EVI5	Sitio de integración viral ectópico 5	0.415	0.10859	0.05506
KIF4A	Quinesina miembro de la familia 4A	-1.089	0.10934	0.05544
CDC25B	División del ciclo celular homologo a 25 B (<i>S. pombe</i>)	-1.453	0.11521	0.05842
KIF20A	Quinesina miembro de la familia 20A	-1.18	0.11801	0.05984

15 6.5 Tamaño celular, senescencia e incremento de inestabilidad genética.

Como ya es bien conocido, el tamaño celular está relacionado con la ploidía celular (revisado en Strochova y Pellman, 2004. Nat Rev Mol Cell. Biol., Vol 5). Algunos autores han descrito que cada duplicación del material genético está acompañada de un incremento de aproximadamente 2 veces el volumen celular en hepatocitos humanos y de ratón. Del mismo modo, el incremento del tamaño celular es una de las más clásicas características que presentan las células senescentes. En base a estas premisas, decidimos seleccionar aquellas células de mayor tamaño y complejidad (células que se acumulan durante los pases [Fig. 9]) a un determinado pase. Pudimos mostrar que estas células de mayor tamaño, fueron incapaces de replicarse durante el cultivo a lo largo del tiempo y que además presentaron una longitud telomérica menor y una gran acumulación de aneuploidia en comparación con sus controles (células pequeñas y menos complejas) (Fig. 10). Estas observaciones indicaban que el incremento de aneuploidia en interfase es un fuerte biomarcador de senescencia de células en cultivo.

REIVINDICACIONES

1. Método de identificación de células madre mesenquimales senescentes que comprende:
 - a. medir la longitud de los telómeros de los cromosomas de la célula madre mesenquimal,
 - b. determinar el nivel de ploidía de la célula madre mesenquimal de la etapa (a),
 - 5 c. analizar la presencia de mitosis multipolar en la célula madre mesenquimal de la etapa (b),
 - d. analizar el nivel de expresión de los genes SCIN, EDN-1, CXCL1, CXCL12 y CD70 en la célula madre mesenquimal de la etapa (c), y
 - e. asociar los datos obtenidos en los pasos (a)-(d) con un fenotipo senescente.
- 10 2. Método de identificación de células madre mesenquimales senescentes según la reivindicación 1, en donde la medición de la longitud de los telómeros de los cromosomas de la etapa (a) se realiza mediante al menos uno de los siguientes métodos: FISH cuantitativo y/o TRAP.
3. Método de identificación de células madre mesenquimales senescentes según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde la determinación del nivel de ploidía de la etapa (b) se realiza mediante la hibridación con sondas cromosómicas específicas y un posterior recuento de su señal fluorescente.
- 15 4. Método de identificación de células madre mesenquimales senescentes según la reivindicación 3, en donde las sondas cromosómicas específicas son sondas CEP.
5. Método de identificación de células madre mesenquimales senescentes según la reivindicación 4, en donde las sondas CEP son específicas de los cromosomas 8, 10, 11 y/o 17.
- 20 6. Método de identificación de células madre mesenquimales senescentes según la reivindicación 5, en donde las sondas CEP son específicas del cromosoma 10.
7. Método de identificación de células madre mesenquimales senescentes según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el fenotipo senescente de la etapa (e) **está caracterizado por** mostrar:
 - a. una reducción en la longitud de los telómeros de los cromosomas en comparación con una célula no senescente,
 - 25 b. aneuploidia,
 - c. mitosis multipolar,
 - d. una expresión elevada de los genes SCIN, y EDN-1, y
 - e. una expresión reducida de los genes CXCL1, CXCL12 y/o CD70.
- 30 8. Método de identificación de células madre mesenquimales senescentes según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde las células madre mesenquimales proceden de un humano.
9. Método de identificación de células madre mesenquimales senescentes según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde además se analiza el nivel de expresión de los genes HIST1H4C, HIST1H4L, HIST1H1C, CENPM, DYNLT3, SPC25, GTSE1, CDC45L, PLK1 y SKA3 en la célula madre mesenquimal, y se asocian los datos obtenidos con un fenotipo senescente.
- 35 10. Método de identificación de células madre mesenquimales senescentes según la reivindicación 9, en donde el fenotipo senescente **se caracteriza por** mostrar:
 - a. una expresión elevada de los genes HIST1H1C y DYNLT3, y
 - b. una expresión reducida de los genes HIST1H4C, HIST1H4L, CENPM, SPC25, GTSE1, CDC45L, PLK1 y SKA3.

11. Kit para la identificación de células madre mesenquimales senescentes que comprende: sondas telómeras PNA, sondas CEP y sondas Taqman que son específicas para los genes SCIN, EDN-1, CXCL1, CXCL12 y CD70.
 12. Kit para la identificación de células madre mesenquimales senescentes según la reivindicación 11, en donde las sondas CEP son específicas de los cromosomas 8, 10, 11 y/o 17.
- 5
13. Kit para la identificación de células madre mesenquimales senescentes según cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, que además comprende sondas PNA, sondas CEP y sondas Taqman específicas para los genes HIST1H4C, HIST1H4L, HIST1H1C, GENPM, DYNLT3, SPC25, GTSE1, CDC45L, PLK1 y SKA3.

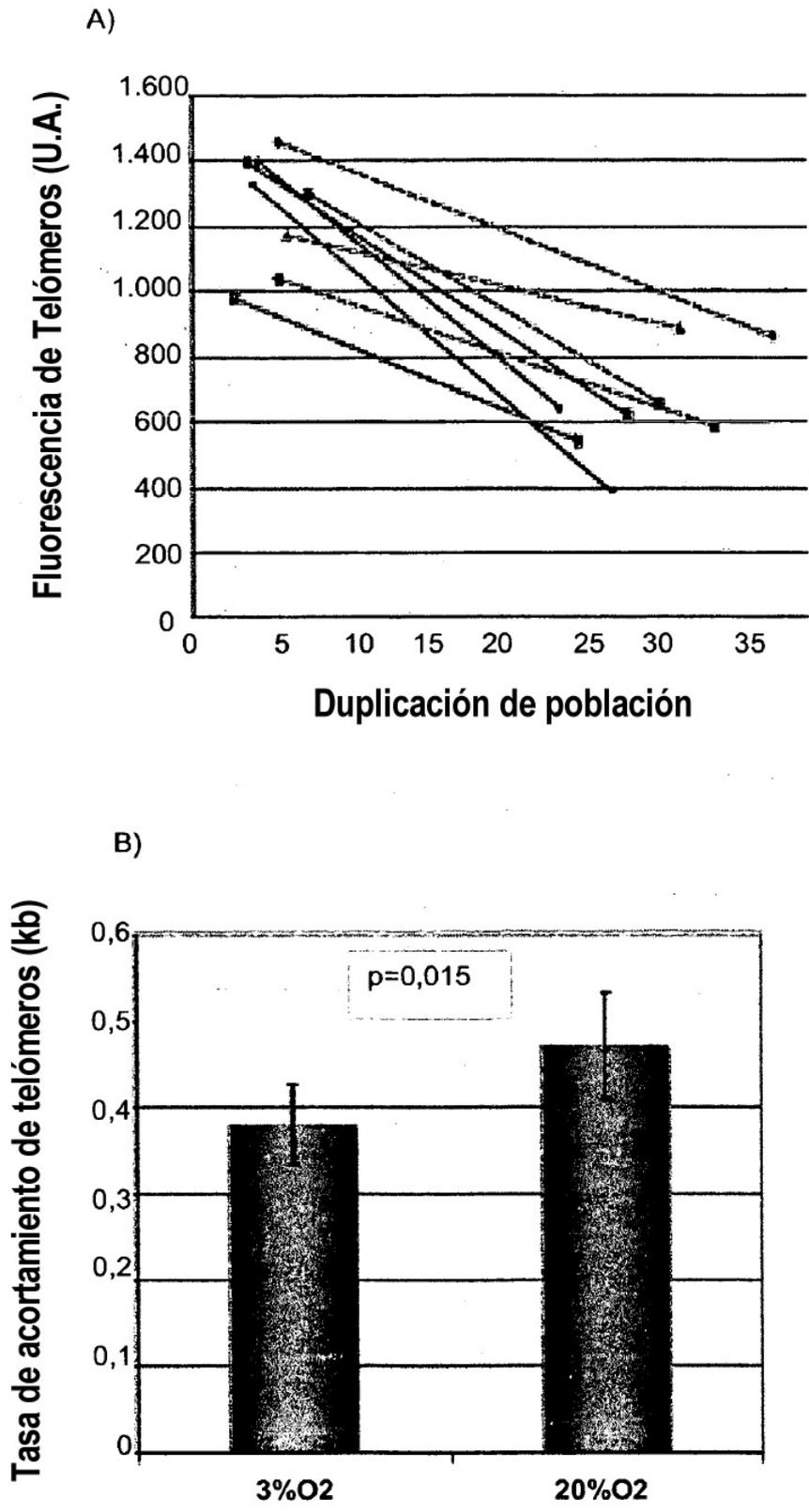


FIG. 1

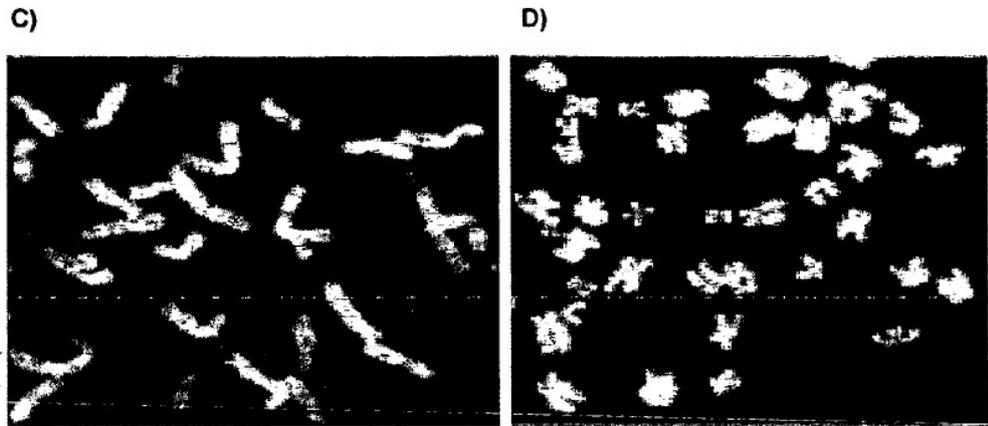


FIG. 1 (cont.)

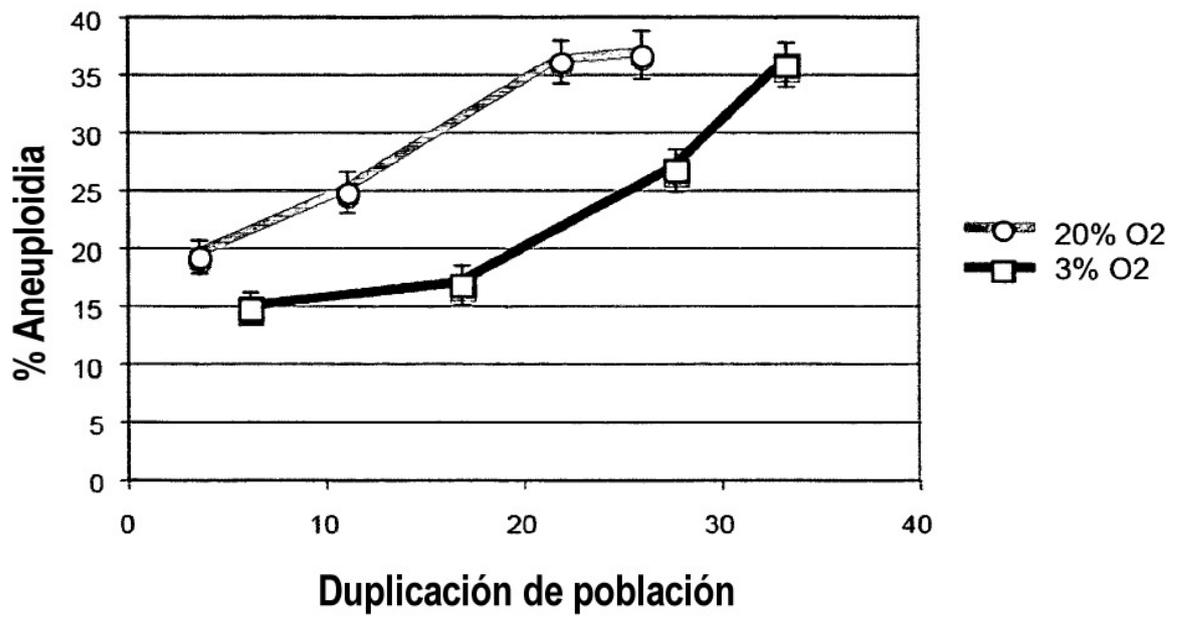


FIG. 2

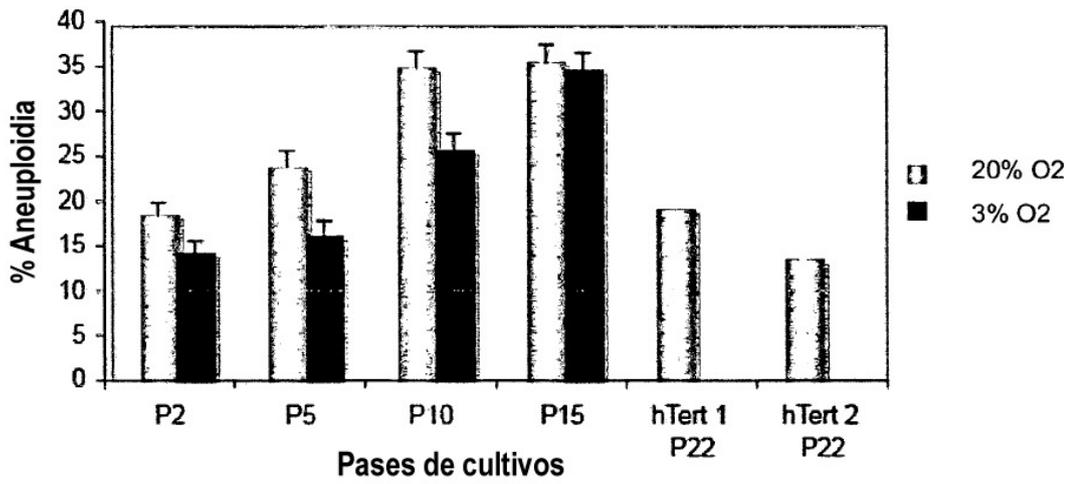


FIG. 3

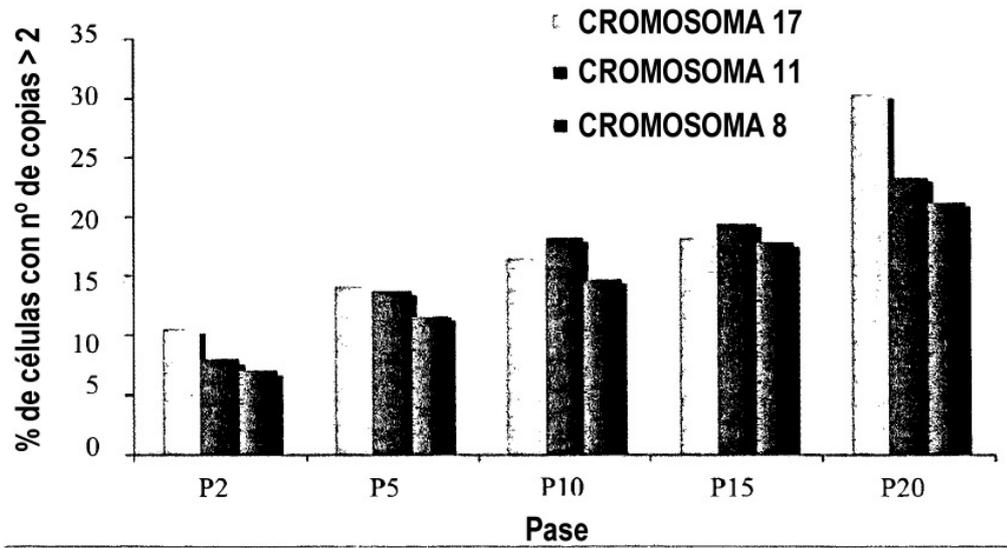


FIG. 4

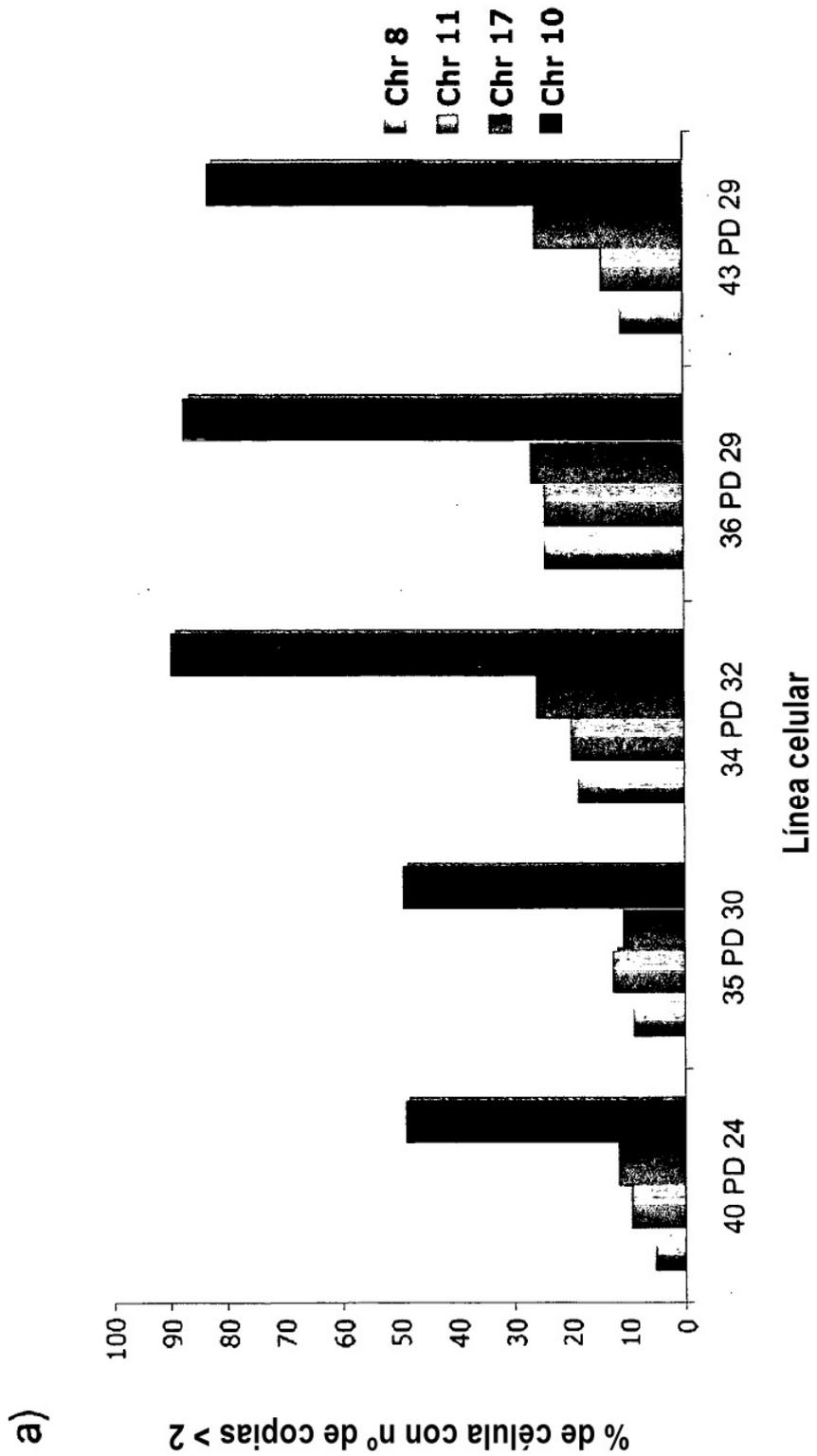


FIG. 5

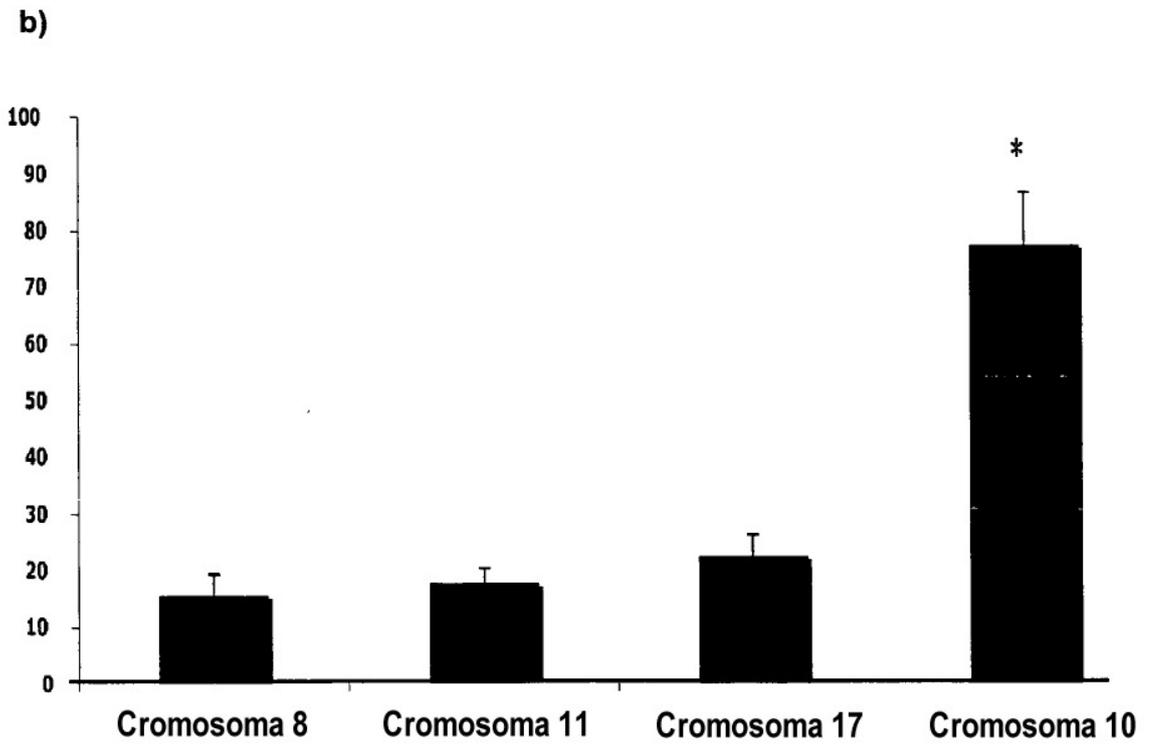


FIG. 5 (cont.)

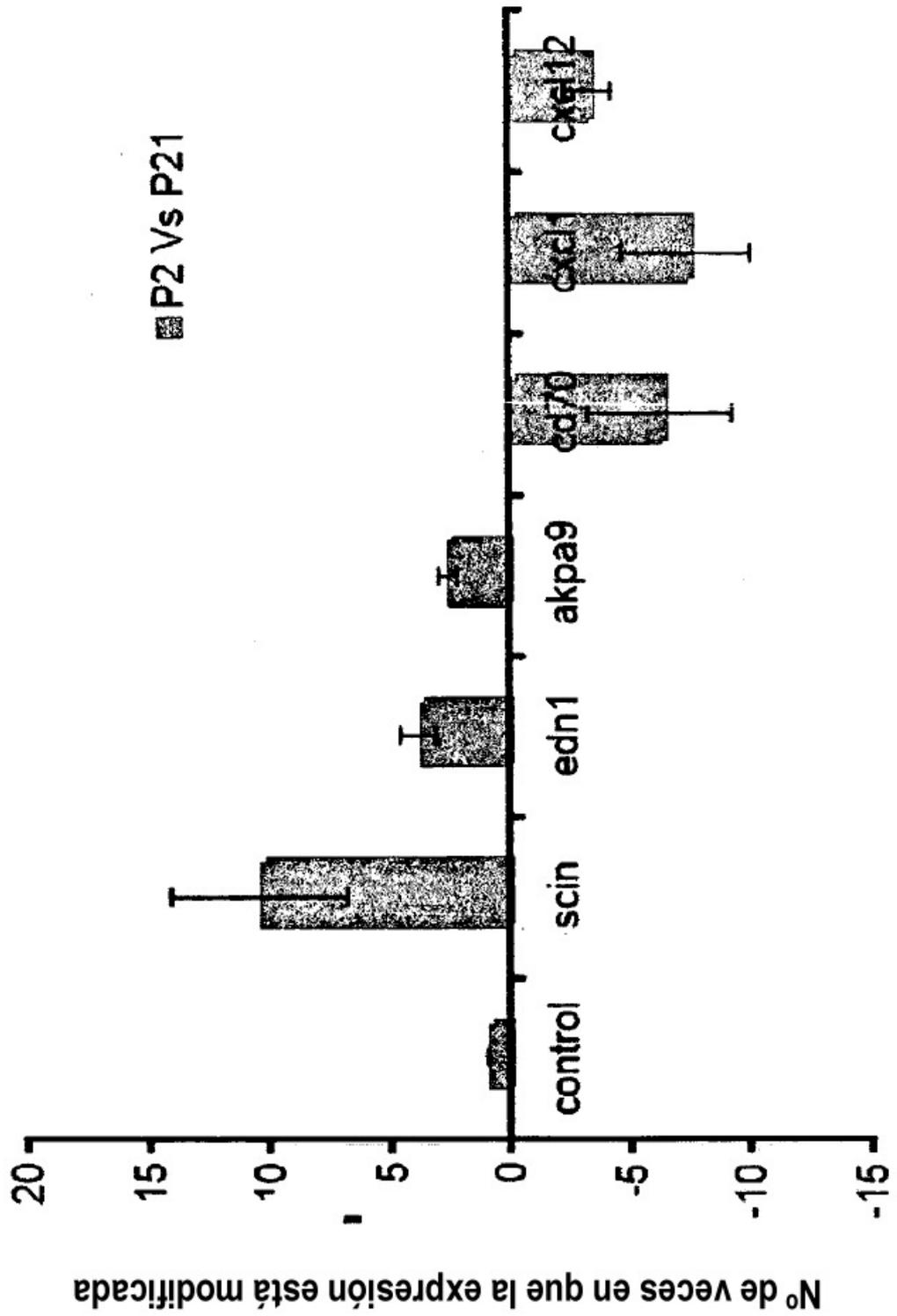


FIG. 6

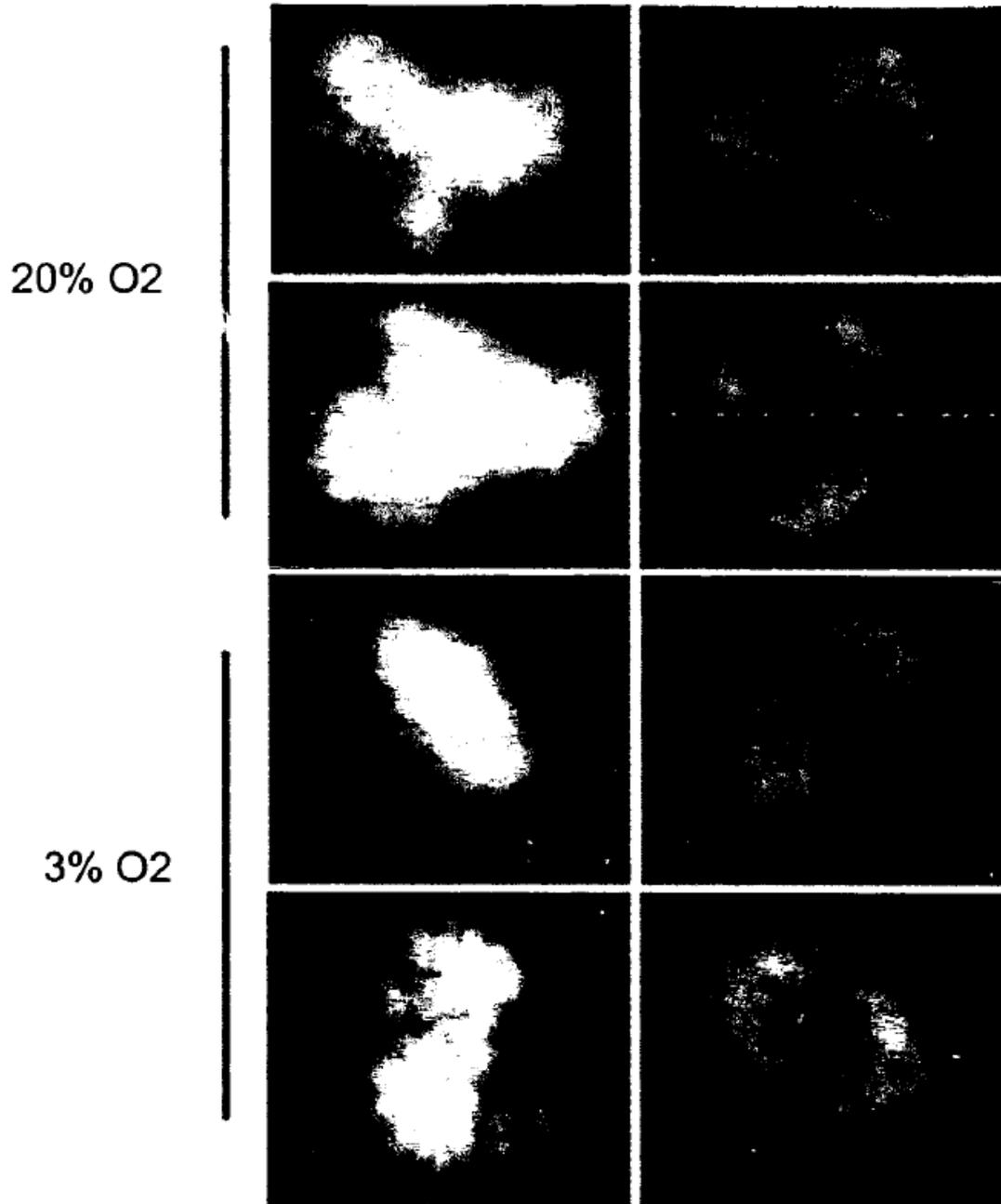


FIG. 7

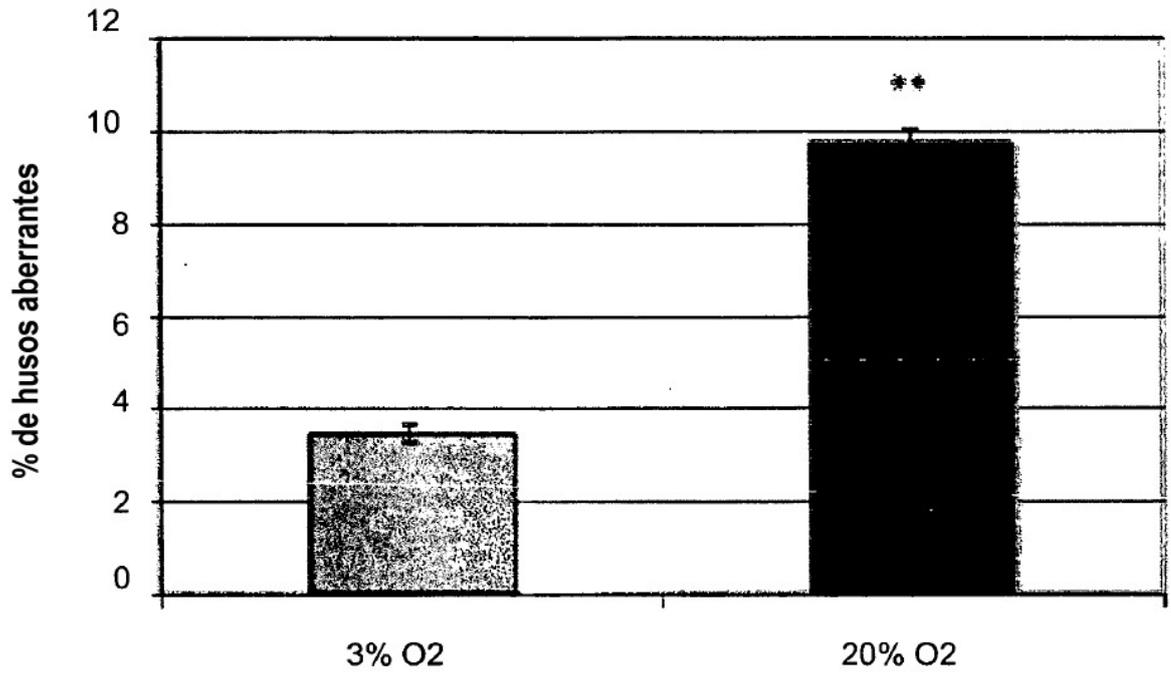
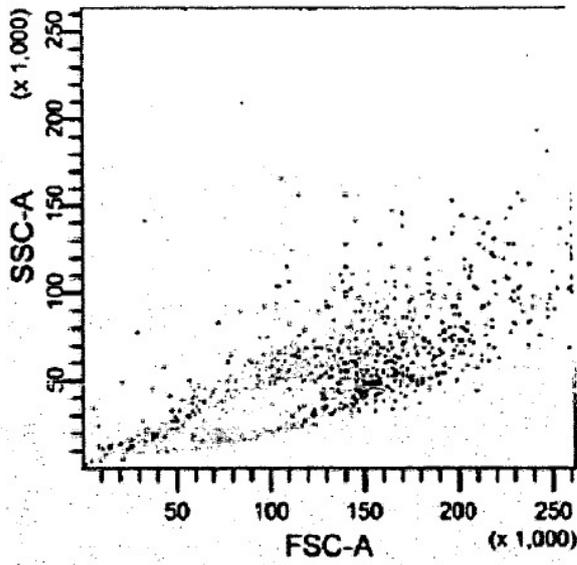
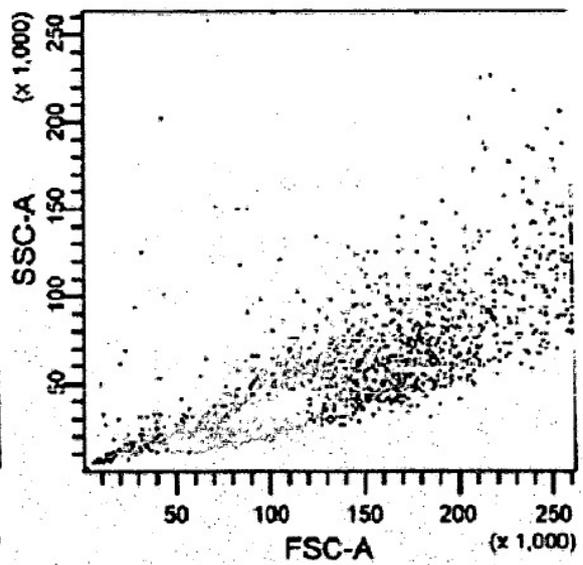


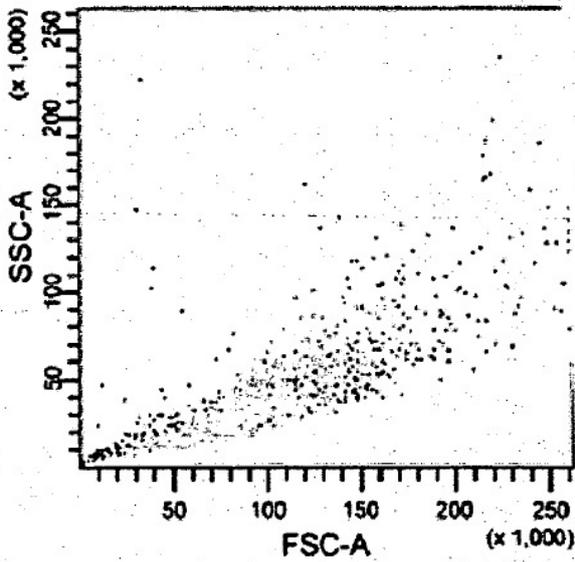
FIG. 8



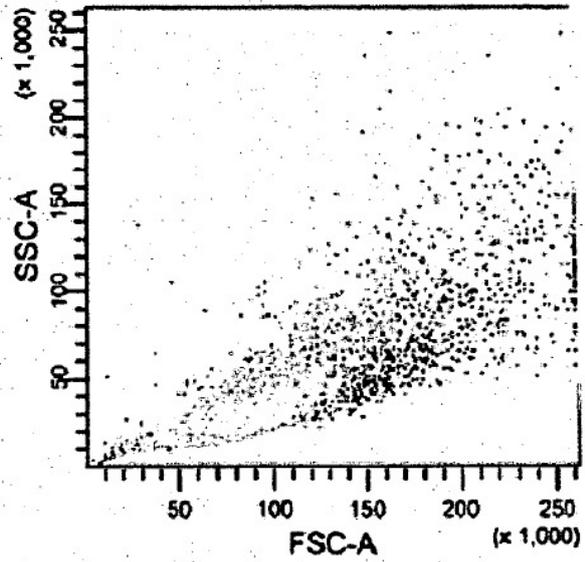
Ft 34-20% pase 7



Ft 36-20% pase 7

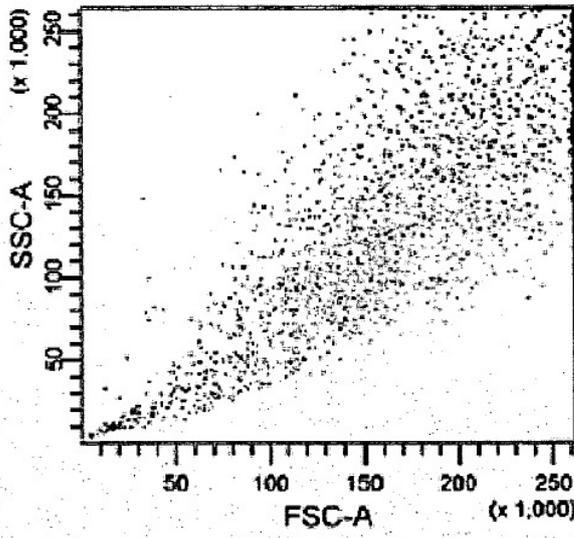


Ft 40-20% pase 7

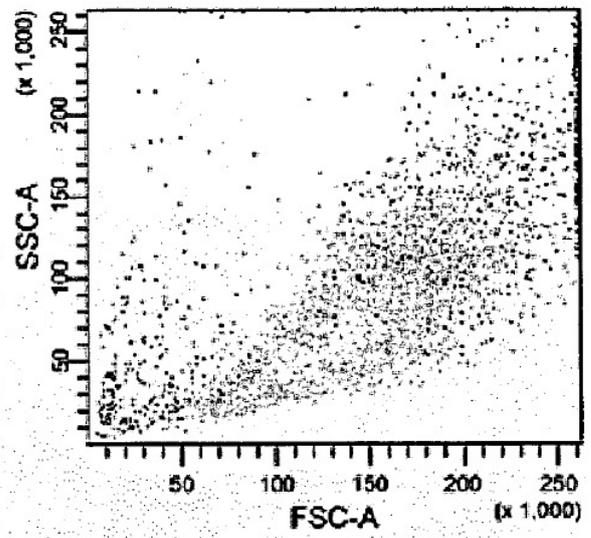


Ft 43-20% pase 7

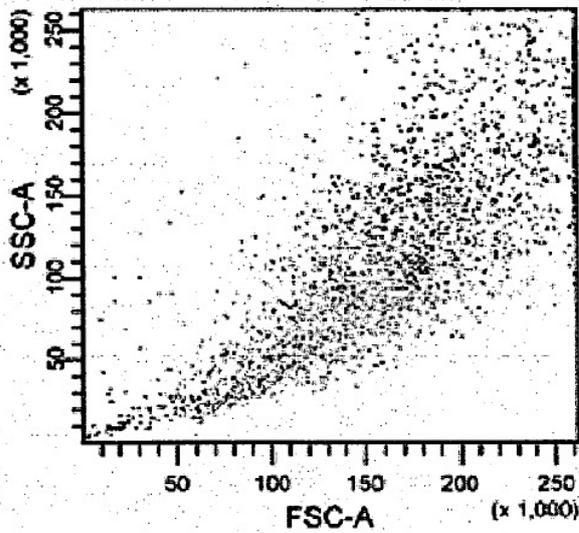
FIG. 9



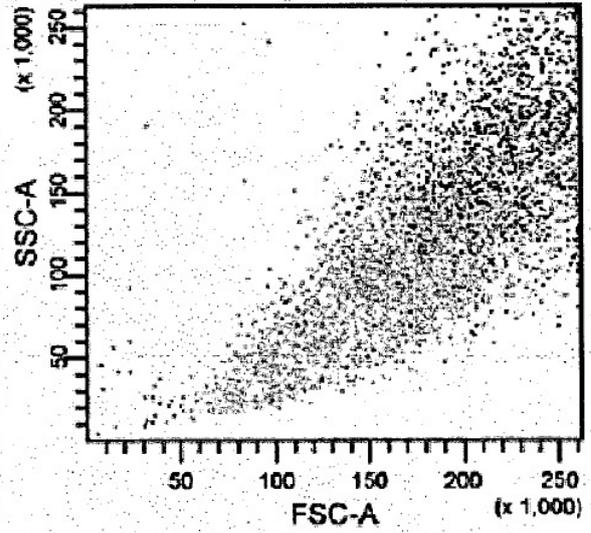
Ft 34-20% pasc 18



Ft 36-20% pasc 18

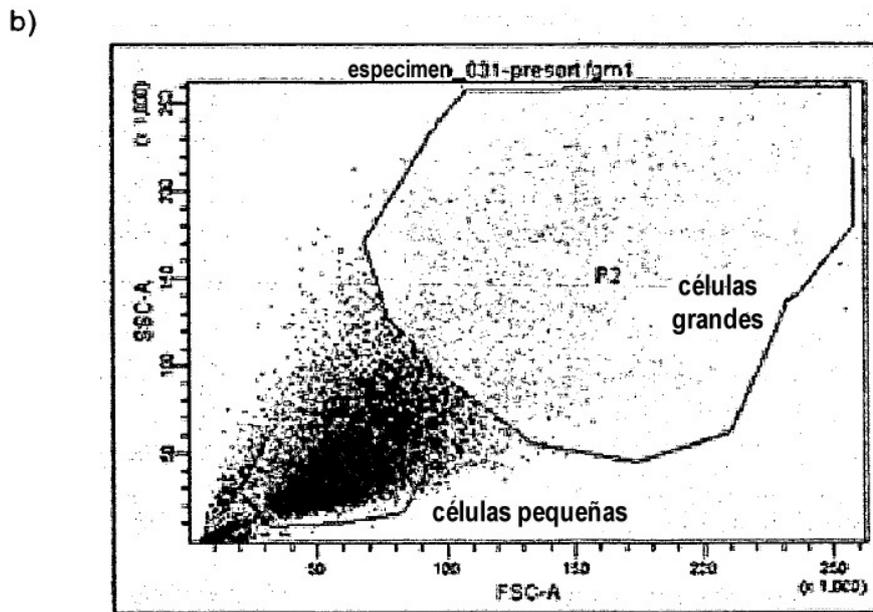
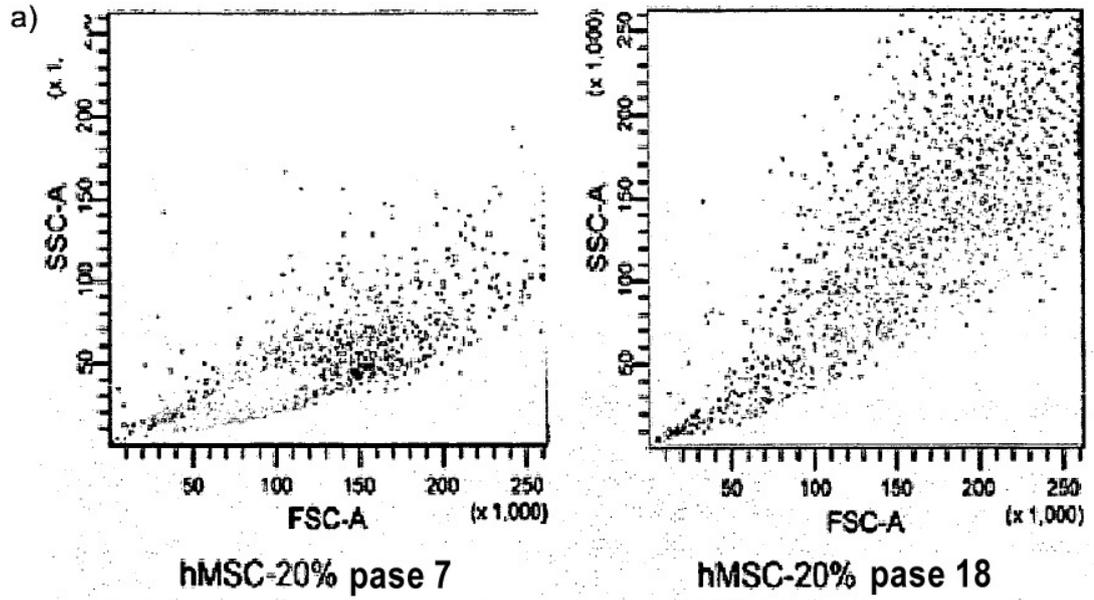


Ft 40-20% pasc 18



Ft 43-20% pasc 18

FIG. 9 (cont.)



hMSC-20% pase 7

FIG. 10

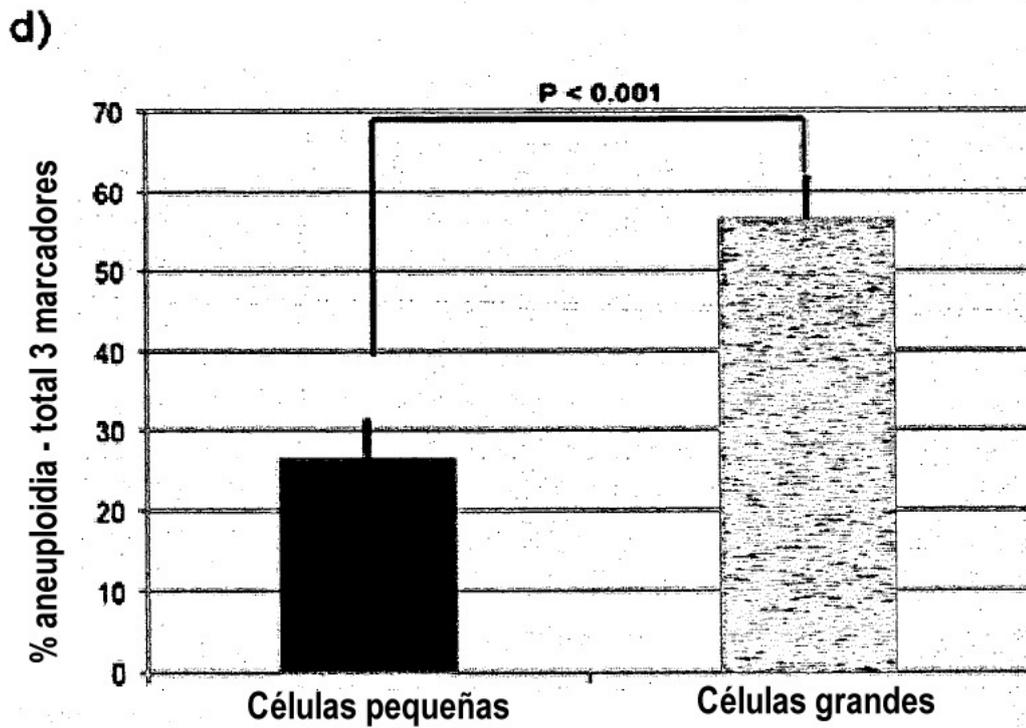
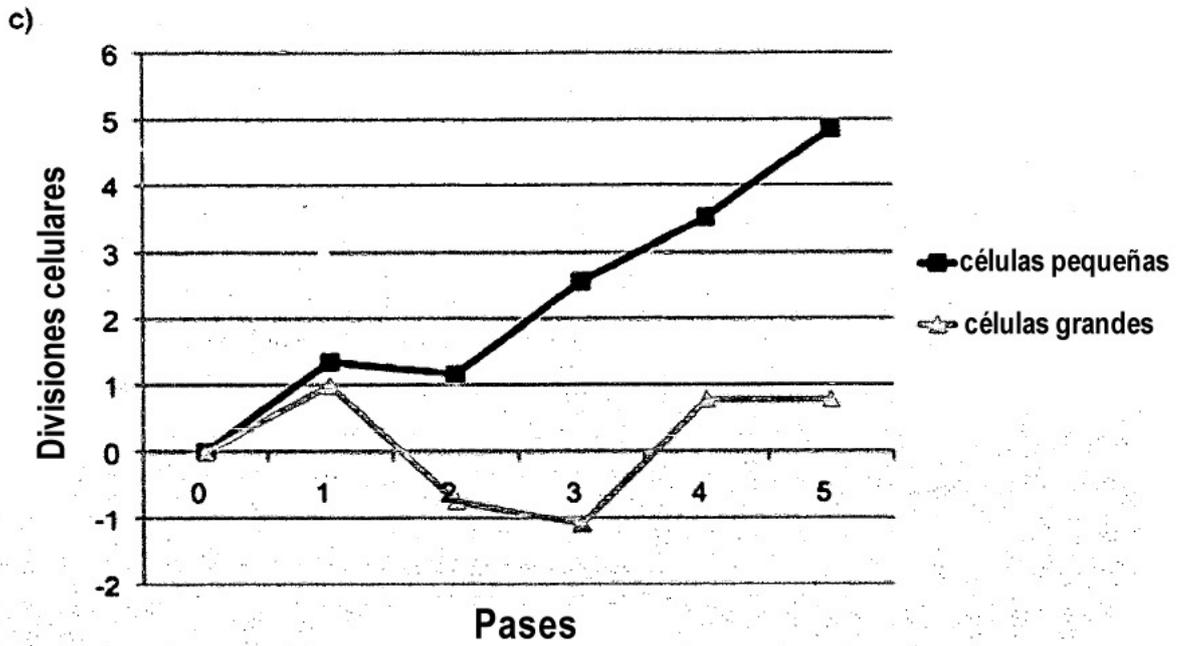


FIG. 10 (cont.)

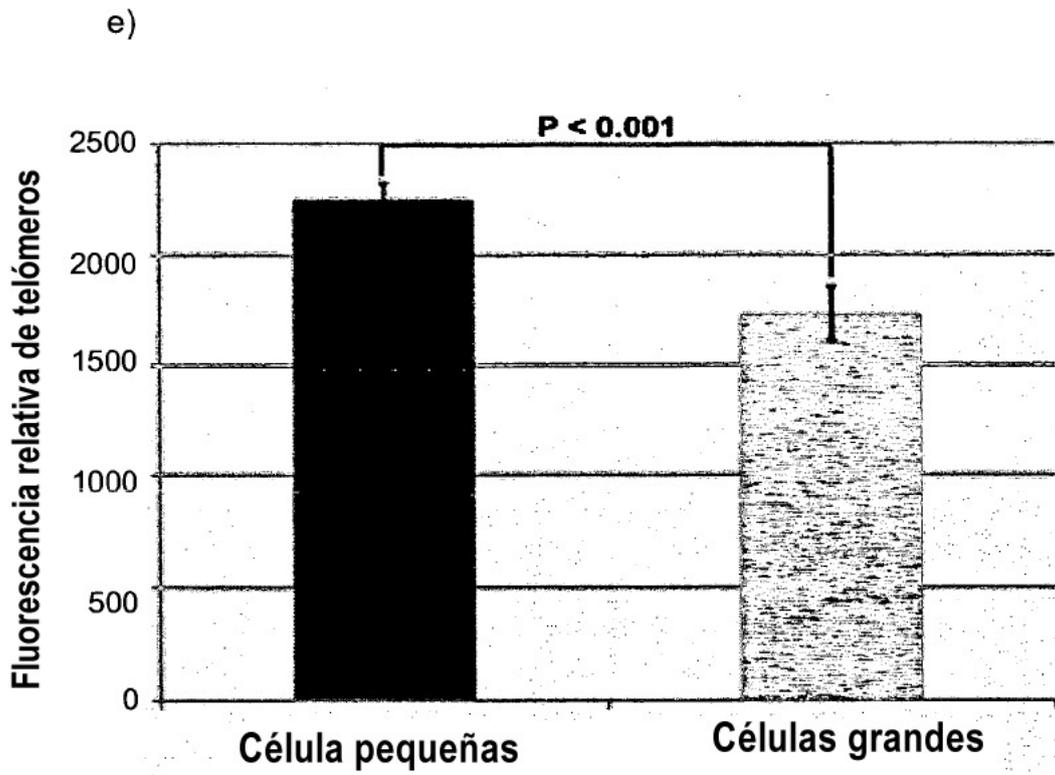


FIG. 10 (cont.)