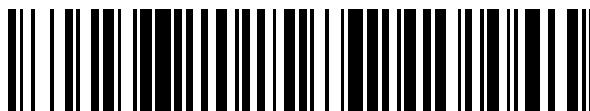


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 520 393**

51 Int. Cl.:

A61K 35/44 (2006.01)

C12N 5/078 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2009** **E 09795654 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014** **EP 2379087**

54 Título: **Células derivadas de tejido del cordón umbilical para tratar dolor neuropático y espasticidad**

30 Prioridad:

19.12.2008 US 139169 P

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

11.11.2014

73 Titular/es:

DEPUY SYNTHES PRODUCTS, LLC (100.0%)
325 Paramount Drive
Raynham, MA 02767-0350, US

72 Inventor/es:

KRAMER, BRIAN C. y
HERZBERG, URI

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 520 393 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).

Células derivadas de tejido del cordón umbilical para tratar dolor neuropático y espasticidad**DESCRIPCIÓN****REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS**

La presente solicitud reivindica el beneficio a la solicitud de patente provisional de Estados Unidos nº 61/139.169 presentada el 19 de diciembre de 2008.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere generalmente a composiciones para tratar dolor neuropático por la administración de células. En particular, la invención proporciona administrar células sistémicamente a un paciente para normalizar estados inflamatorios o degenerativos o un estado de patología del sistema nervioso. Una patología tal podría estar en el medio subcelular, celular y tisular, modificando así las interacciones neuronales y disminuyendo el dolor.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Diversas patentes y otras publicaciones se citan en toda la memoria descriptiva.

El dolor crónico en general es un problema de salud pública que afecta al 30-60 % de todos los estadounidenses. En la mayoría de los casos, hay poca o ninguna correlación entre los hallazgos de enfermedad objetiva (rayos X, IRM y TAC de la región en dolor) e informes de dolor subjetivo. El dolor crónico incluye dolor que persiste más allá del tiempo de curación normal para una enfermedad o lesión, dolor relacionado con enfermedad degenerativa crónica o una afección neurológica persistente, dolor que emerge o persiste, incluso que se repite durante meses a años sin una causa identificable, o como dolor asociado al cáncer.

El dolor crónico se produce frecuentemente por trastornos del sistema nervioso, también conocida como neuropatía o dolor neuropático. El dolor neuropático normalmente va acompañado por daño de tejido, que incluye fibras nerviosas que son dañadas, funcionan mal o son lesionadas. El dolor neuropático puede producirse mediante una variedad de problemas, que incluyen lesiones patológicas, procesos de neurodegeneración, o disfunción prolongada de partes del sistema nervioso periférico o central. El dolor neuropático también puede estar presente cuando no puede evaluarse o definirse lesión detectable.

La bibliografía clínica y científica señala que el dolor neuropático tiene dos componentes: plasticidad central y cambios en los nervios periféricos. La plasticidad central puede ser el resultado de cambios en la población de receptores o sensibilidad de los receptores a cualquier nivel del CNS. Además, hay pruebas que señalan que tienen lugar cambios en las neuronas y en la microglía. En realidad, datos recientes indican a la actividad de la microglía como un mediador importante de la sensibilización central de la médula espinal. Tal sensibilización central es conocida por desempeñar una función importante en mediar en el dolor inflamatorio crónico, además de neuropático. En la periferia, los cambios en la interacción de células de Schwann - axones son conocidos por desempeñar una función en la inducción y mantenimiento de dolor neuropático.

El curso normal del tratamiento para dolor crónico implica un enfoque de escalera de etapas que empieza con analgésicos no opiáceos y progresa de opiáceos moderados a opiáceos potentes. Los opiáceos se usan frecuentemente en combinación con otros agentes. De esta forma, un médico puede monitorizar y ajustar la dosis del agente para limitar los efectos secundarios no deseados de los opiáceos, que incluyen sedación, deterioro cognitivo, mioclonos, adicción, tolerancia y depresión respiratoria. Sin embargo, los opiáceos también pueden inducir náuseas, estreñimiento, confusión, depresión respiratoria y dependencia. Además, la tolerancia a los opiáceos es un efecto secundario bien documentado observado en pacientes con dolor crónico.

Otros agentes usados para tratar dolor crónico incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), que son tanto antiinflamatorios como analgésicos, antidepresivos, anticonvulsivos, agentes tópicos, cannabinoides, toxina botulínica, antagonistas de NMDA, antiepilépticos, antidepresivos y suplementos dietéticos. Estos compuestos, sin embargo, tienen todos efectos secundarios que pueden ser debilitantes, que incluye depresión del SNC, efectos cardiovasculares, alteraciones gastrointestinales, ulceración, lesión renal, disminución de la libido y reacciones de hipersensibilidad. Además, estos compuestos deben tomarse repetidamente, normalmente más de una vez al día, y algunos compuestos se vuelven ineficaces con el tiempo, produciendo tolerancia al fármaco.

Además, los actuales tratamientos son incapaces de aliviar el dolor en muchos trastornos neuropáticos crónicos clínicamente graves, tales como neuropatía diabética, radiculopatía cervical, amiotrofia neurálgica, neuropatía por VIH, amiotrofia neurálgica o neuralgia posherpética. Otras afecciones crónicas intratables para las actuales estrategias médicas están asociadas a dolor periférico y/o centrales tal como, después de lesión de la médula espinal, distrofia muscular, neuralgia del trigémino, dolor del miembro fantasma, síndrome de fibromialgia, causalgia, y polineuropatías diabéticas y alcohólicas. La espasticidad de origen de la médula espinal, que resulta de esclerosis

múltiple o lesión de la médula espinal, es otra afección que frecuentemente resiste a los actuales tratamientos y que puede producir dolor crónico.

Actualmente, hay interés en usar células trasplantadas en el sitio del daño neural para ayudar en la reparación o inversión del daño de células neurales. Por ejemplo, algunos investigadores han trasplantado células neurales al sitio de lesión de un paciente con un trastorno o lesión de la ruta neural sensorial. Véase la solicitud de patente de EE.UU. nº 09/163.684 que se concedió como la patente de EE.UU. nº 6.444.205. Otros investigadores se basan en el trasplante de citoblastos para reconstituir un tejido diana, restaurando así la funcionalidad fisiológica y anatómica. Por ejemplo, Klass administró células mononucleares de médula ósea que contienen poblaciones de citoblastos a un modelo de dolor neuropático para encontrar si disminuía el dolor. Véase Klass y col., *Anesth Analg.*, 2007; 104:944 - 49. Actualmente no existe un procedimiento fidedigno viable de administración de células para reducir el dolor neuropático.

Dadas las limitaciones anteriores en el tratamiento de dolor crónico y neuropático, existe una necesidad de aliviar el dolor crónico y neuropático en individuos con tratamientos que no necesiten administrarse diariamente.

RESUMEN DE LA INVENCION

Los problemas presentados se resuelven por las composiciones de las realizaciones ilustrativas descritas en el presente documento. Estas realizaciones proporcionan procedimientos de tratamiento de dolor crónico y neuropático administrando una población de células. Aunque no se desea ligarse a mecanismo de acción alguno, los inventores creen que las células administradas tienen la capacidad de normalizar medio celular inflamatorio o degenerativo y de tejido en la interacción de células de Schwann - axones y/o la interacción de la microglía - neuronas para reducir el dolor. Además, la administración de células puede bloquear el disparo neuronal ectópico, disminuyendo así el dolor. La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que esas células, que incluyen células derivadas de tejido del cordón umbilical humano, pueden administrarse sistémicamente a un paciente en necesidad de tratamiento de dolor crónico.

Opciones específicas proporcionadas por la invención se refieren a la reparación directa, regeneración, sustitución de, o el soporte de la reparación, regeneración o sustitución de células neurales para el tratamiento de daño neural, lesión y/o dolor.

La divulgación también se refiere a un procedimiento de tratamiento de un sujeto que tiene daño neural, lesión y/o dolor administrando una población de células en una cantidad eficaz, de forma que se trata la lesión, lesión y/o dolor. Las células administradas son células derivadas de tejido del cordón umbilical.

Las células se administran sistémicamente.

Las células pueden administrarse mediante cualquier medio que permita la distribución sistémica de las células, que incluye, pero no se limita a, administración intramuscular, intravenosa, o intrarterial mediante jeringas con agujas y/o catéteres con o sin dispositivos de bomba. En algunas realizaciones específicas, la población de células se administra con un hidrogel. Otras realizaciones son para hidrogeles específicos, tales como colágeno, atelocolágeno, construcciones de fibrina, construcciones de trombina-fibrina. Además, algunas realizaciones incluyen el uso de uno o más factores de crecimiento inyectados en paralelo, secuencialmente o formulados directamente en un hidrogel.

En algunas realizaciones, la población de células se induce *in vitro* para diferenciarse en un tipo específico de célula. En otras realizaciones, las células se manipulan genéticamente para producir un producto génico que promueve el tratamiento de dolor crónico.

En algunas realizaciones, las poblaciones de células se administran con al menos otro agente, que incluye, pero no se limita a, componentes de la matriz extracelular seleccionados, agentes antiapoptóticos, compuestos antiinflamatorios, agentes inmunosupresores o inmunomoduladores, anestésicos locales y otros factores angiogénicos. El otro agente puede administrarse simultáneamente con, antes o después de la población de células. En una realización, la composición comprende además al menos uno de los agentes o factores seleccionados del grupo que consiste en factores neurotróficos. En una realización, la población de células se administra con factores de crecimiento y/u otros agentes que promueven la diferenciación de las células en una célula neural deseada predeterminada. En otra realización, las células neurales deseadas pueden secretar uno o más neurotransmisores.

En el presente documento también se desvelan composiciones y kits para tratar un paciente con dolor crónico que comprenden al menos una población de células y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Otras formas de composición y kit pueden incluir otros agentes, factores de crecimiento y compuestos para promover el crecimiento y/o curación del tejido, de forma que el dolor crónico disminuya en gravedad o duración. Las composiciones farmacéuticas y kits se diseñan y/o formulan para poner en práctica los procedimientos de la divulgación como se explican resumidamente anteriormente y más adelante.

Otros objetivos, características y ventajas de las realizaciones ilustrativas serán evidentes con referencia a los

dibujos y la descripción detallada que sigue.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 5 La Figura 1 es una fotografía en color que muestra la viabilidad de células hUTC después de cuatro días de implantación en una construcción.
- La Figura 2 es una gráfica que muestra el efecto de la inyección local sobre animales separados en los grupos de construcción, vehículo y lesión.
- 10 La Figura 3 es una gráfica que muestra el efecto de la inyección sistémica sobre animales separados en los grupos de construcción, vehículo y lesión.
- La Figura 4 es una gráfica que muestra los resultados con colágeno (Colbar). La administración se llevó a cabo localmente al lado afectado (izquierdo). El cambio de dolor neuropático es (puntuación en el día probado tras la administración - puntuación en el dolor neuropático/puntuación en el dolor neuropático x 100).
- 15 La Figura 5 es una gráfica que muestra los resultados con colágeno (Colbar). La administración se llevó a cabo localmente al lado contralateral (derecho). El cambio de dolor neuropático es (puntuación en el día probado tras la administración - puntuación en el dolor neuropático/puntuación en el dolor neuropático x 100).
- 20 La Figura 6 es una gráfica que muestra los resultados con Evicel (Omnix). La administración se llevó a cabo localmente al lado afectado (izquierdo). El cambio de dolor neuropático es (puntuación en el día probado tras la administración - puntuación en el dolor neuropático/puntuación en el dolor neuropático x 100).
- 25 La Figura 7 es una gráfica que muestra los resultados con Evicel (Omnix). La administración se llevó a cabo localmente al lado contralateral (derecho). El cambio de dolor neuropático es (puntuación en el día probado tras la administración - puntuación en el dolor neuropático/puntuación en el dolor neuropático x 100).
- 30 La Figura 8 es una gráfica que muestra los resultados de hUTC. La administración fue sistémica y el cambio de dolor neuropático es (puntuación en el día probado tras la administración - puntuación en el dolor neuropático/puntuación en el dolor neuropático x 100).
- 35 La Figura 9 es una gráfica que muestra los resultados de hUTC. La administración fue sistémica y el cambio de dolor neuropático es (puntuación en el día probado tras la administración - puntuación en el dolor neuropático/puntuación en el dolor neuropático x 100).
- Las Figuras 10A-C contienen resultados estadísticos para la Figura 4.
- 40 Las Figuras 11A-C contienen resultados estadísticos para la Figura 5.
- Las Figuras 12A-C contienen resultados estadísticos para la Figura 6.
- Las Figuras 13A-C contienen resultados estadísticos para la Figura 7.
- 45 Las Figuras 14A-C contienen resultados estadísticos para la Figura 8.
- Las Figuras 15A-C contienen resultados estadísticos para la Figura 9.
- 50 La Figura 16 es una representación esquemática de la operación y tratamiento para los procedimientos de prueba en el Ejemplo 4.
- La Figura 17 proporciona el peso corporal medio para los grupos.
- 55 La Figura 18 es el aumento de peso corporal después de cirugía de Chung y tratamiento con hUTC por administración sistémica.
- La Figura 19 es la delta media de la respuesta de Von Frey. El cálculo usado fue: media de la pata derecha menos media de la pata izquierda.
- 60 La Figura 20 es la delta media de la respuesta de Von Frey de la retirada de la pata después de cirugía de Chung y después de la administración sistémica de hUTC en el día de estudio 6.
- La Figura 21 es la delta media de la respuesta de Von Frey de la retirada de la pata después de cirugía de Chung y la administración sistémica de hUTC en el día 6.
- 65

La Figura 22 es la media del examen de Von Frey.

La Figura 23 es la diferencia entre patas (representada por el log de la fuerza de retirada mínimo de la pata derecha dividido entre el log de la fuerza de la pata izquierda) después de la administración sistémica de hUTC en el día de estudio 6 tras la cirugía de Chung.

Las Figuras 24A-C son tablas de datos individuales del peso corporal individual.

Las Figuras 25A-C son tablas de datos individuales de respuesta de Von Frey.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En la siguiente descripción detallada de las realizaciones ilustrativas se hace referencia a los dibujos adjuntos que forman una parte del presente documento. Estas realizaciones se describen en detalle suficiente para permitir que aquellos expertos en la materia pongan en práctica la invención, y se entiende que otras realizaciones pueden utilizarse y que pueden hacerse cambios estructurales, mecánicos, eléctricos y químicos lógicos sin apartarse del alcance de la invención. Para evitar detalles no necesarios para permitir que aquellos expertos en la materia pongan en práctica las realizaciones descritas en el presente documento, la descripción puede omitir cierta información conocida para aquellos expertos en la materia. Por tanto, la siguiente descripción detallada no debe tomarse en un sentido limitante.

Para aclarar mejor la invención, se proporcionan las siguientes definiciones.

Los términos “dolor crónico” y “dolor neuropático”, como se usan indistintamente en el presente documento, generalmente se refieren a afecciones en las que el dolor persiste y deja de responder a tratamiento convencional. Estos términos incluyen dolor de larga duración y dolor que puede ser médicamente resistente. Estos términos también incluyen dolor caracterizado por un aumento persistente en el nivel de excitabilidad de las neuronas o la presencia de sensaciones anormales en el área afectada. Afecciones de dolor crónico a modo de ejemplo incluyen neuropatía diabética, radiculopatía cervical, amiotrofia neurálgica, neuropatía por VIH, amiotrofia neurálgica, neuralgia posherpética, después de lesión de la médula espinal, distrofia muscular, neuralgia del trigémino, dolor del miembro fantasma, causalgia, espasticidad de origen de la médula espinal y polineuropatías diabéticas y alcohólicas.

Los términos “sitio de tejido”, “daño neural”, “lesión neural” y “sitio de daño neural”, como se usan en el presente documento, son intercambiables y generalmente se refieren a una herida o defecto localizado sobre, dentro de o adyacente a tejido neural de un individuo; y puede incluir, pero no se limita a, tejido dérmico, tejido vascular, tejido conjuntivo, cartílago, tejido adiposo, tejido de músculo, tendones o ligamentos. Los términos pueden referirse adicionalmente a áreas de cualquier tejido que no están necesariamente heridas o son defectuosas, pero que en su lugar son áreas en las que se desea añadir o promover el crecimiento de tejido adicional. El término también puede referirse a tejido nervioso que, aunque no tiene daño aparente, observaciones clínicas, pruebas e informes de los pacientes indican la presencia de una anomalía.

Los términos “individuo”, “paciente” o “sujeto”, como se usan en el presente documento, generalmente se refieren a cualquier forma de animal, que incluye mamíferos, tales como seres humanos y monos, que se tratan con las composiciones farmacéuticas o terapéuticas o según los procedimientos descritos. El término “xenogénico”, como se usa en el presente documento, se refiere al trasplante de células de un donante de una especie a un sujeto de una especie diferente.

Los términos “tratan”, “tratar” o “tratamiento”, como se usan en el presente documento, generalmente se refieren a mejora o reducción en el dolor o lesión durante un periodo de tiempo tras la administración de una población de células en un sujeto que padece dolor crónico. La mejora o reducción también incluye cualquier parámetro objetivo o subjetivo tal como alivio, remisión, disminución de los síntomas o hacer la lesión, patología o afección más tolerable al paciente, ralentizando la tasa de degeneración o disminución, haciendo el punto final de la degeneración menos debilitante, mejorando el bienestar físico o mental del sujeto, o prolongando la duración de la supervivencia. El tratamiento o mejora de los síntomas puede basarse en parámetros objetivos o subjetivos; que incluyen los resultados de un examen físico o examen neurológico.

Los términos “periodo eficaz”, “periodo de tiempo eficaz” o “condiciones eficaces” se refieren generalmente a un periodo de tiempo u otras condiciones controlables (por ejemplo, temperatura, humedad para procedimientos *in vitro*) necesarias o preferidas para un agente o composición farmacéutica para lograr su resultado previsto.

El término “cantidad eficaz”, como se usan en el presente documento, generalmente se refiere a una concentración o cantidad de un compuesto, material o composición, como se describe en el presente documento, que es eficaz para lograr un resultado biológico particular. Tales resultados incluyen, pero no se limitan a, la regeneración, reparación o mejora de tejido neural, la mejora de la circulación sanguínea y/o la disminución de la inflamación en pacientes con dolor crónico. Tal actividad eficaz puede lograrse, por ejemplo, administrando las células y/o composiciones de la

presente invención a pacientes con dolor crónico. Con respecto a la población de células como se administran a un paciente, una cantidad eficaz es generalmente más aproximadamente 10^4 células/kg de peso corporal, y puede oscilar de aproximadamente 10^4 células/kg de peso corporal a aproximadamente 10^6 células/kg de peso corporal cuando se administra localmente, o de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^7 células/kg de peso corporal cuando se administra sistémicamente. En realizaciones específicas, una cantidad eficaz puede oscilar de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^8 células/kg de peso corporal. Se apreciará que el número de células que va a administrarse variará dependiendo de la especificidad del trastorno que va a tratarse, que incluye, pero no se limita a, tamaño o volumen total/área superficial que va a tratarse, y proximidad del sitio de administración a la localización de la región que va a tratarse, entre otros factores conocidos para el biólogo médico.

Los "citoblastos" son células no diferenciadas definidas por la capacidad de una única célula tanto para auto-renovarse como para diferenciarse para producir células de progenie, que incluyen progenitores de auto-renovación, progenitores de no renovación y células terminalmente diferenciadas. Los citoblastos también se caracterizan por su capacidad para diferenciarse *in vitro* en células funcionales de diversos linajes celulares de múltiples capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), además de dar lugar a tejidos de múltiples capas germinales tras el trasplante, y contribuir sustancialmente a la mayoría de, si no a todos, los tejidos tras la inyección en blastocistos.

Los citoblastos se clasifican según su potencial de desarrollo como: (1) *totipotentes*; (2) *pluripotentes*; (3) *multipotentes*; (4) *oligopotentes*; y (5) *unipotentes*. Las células *totipotentes* pueden dar lugar a todos los tipos de células embrionarias y extraembrionarias. Las células *pluripotentes* pueden dar lugar a todos los tipos de células embrionarias. Las células *multipotentes* incluyen aquellas que pueden dar lugar a un subconjunto de linajes celulares, pero todos dentro de un tejido, órgano o sistema fisiológico particular. Por ejemplo, los citoblastos hematopoyéticos (HSC) pueden producir progenie que incluye HSC (auto-renovación), progenitores oligopotentes limitados a los glóbulos sanguíneos, y todos los tipos de células y elementos (por ejemplo, plaquetas) que son los componentes normales de la sangre. Las células que son *oligopotentes* pueden dar lugar a un subconjunto más limitado de linajes celulares que los citoblastos multipotentes. Las células que son *unipotentes* pueden dar lugar a un único linaje celular (por ejemplo, citoblastos espermatogénicos).

Los citoblastos también se clasifican basándose en la fuente de la que se obtienen. Un "*citoblasto adulto*" es generalmente una célula no diferenciada multipotente encontrada en tejido que comprende múltiples tipos de células diferenciadas. El citoblasto adulto puede renovarse a sí mismo. Bajo circunstancias normales, también puede diferenciarse para dar los tipos de células especializadas del tejido del que se originó, y posiblemente otros tipos de tejido. Un "*citoblasto embrionario*" es una célula pluripotente de la masa de células interna de un embrión en etapa de blastocisto. Un citoblasto *fetal* es uno que se origina de tejidos o membranas fetales. Un "*citoblasto postparto*" es una célula multipotente o pluripotente que se origina sustancialmente a partir de tejido extraembrionario disponible después del parto, concretamente, la placenta y el cordón umbilical. Se ha encontrado que estas células poseen características de citoblastos pluripotentes, que incluyen proliferación rápida y el potencial de diferenciación en muchos linajes celulares. Los citoblastos postparto pueden derivarse de la sangre (por ejemplo, como son aquellos obtenidos de sangre del cordón umbilical) o no derivarse de la sangre (por ejemplo, como se obtiene de tejidos no sanguíneos del cordón umbilical y la placenta).

Se usan diversos términos para describir células en cultivo. "Cultivo celular" se refiere generalmente a células tomadas de un organismo vivo y cultivadas bajo condición controlada ("en cultivo" o "cultivadas"). Un "cultivo celular primario" es un cultivo de células, tejidos u órganos tomados directamente de un organismo(s) antes del primer subcultivo. Las células se "expanden" en cultivo cuando se ponen en un medio de crecimiento en condiciones que facilitan el crecimiento y/o división celular, produciendo una mayor población de las células. Cuando las células se expanden en cultivo, la tasa de proliferación celular se mide algunas veces por la cantidad de tiempo necesario para que las células se dupliquen en número. Esto se denomina "tiempo de duplicación".

El término "condiciones de crecimiento estándar", como se usa en el presente documento, se refiere al cultivo de células a 37 °C, en una atmósfera estándar que comprende 5 % de CO₂ y humedad relativa mantenida a aproximadamente el 100 %. Aunque las anteriores condiciones son útiles para el cultivo, debe entenderse que tales condiciones pueden variarse por el experto, que apreciará las opciones disponibles en la materia para cultivar células.

Un "medio acondicionado" es un medio en el que se ha cultivado una célula específica o población de células, y luego sacado. Cuando las células se cultivan en un medio, pueden secretar factores celulares que pueden proporcionar soporte trófico a otras células. Tales factores tróficos incluyen, pero no se limitan a, hormonas, citocinas, matriz extracelular (ECM), proteínas, vesículas, anticuerpos y gránulos. El medio que contiene los factores celulares es el medio acondicionado.

La "diferenciación" es el proceso por el que una célula no especializada ("no comprometida") o menos especializada adquiere las características de una célula especializada, tal como, por ejemplo, una célula nerviosa o una célula de músculo. Una célula "diferenciada" es una que ha adoptado una posición más especializada ("comprometida") dentro del linaje de una célula. El término "comprometida", cuando se aplica al procedimiento de diferenciación, se refiere a una célula que ha progresado en la ruta de diferenciación a un punto en el que, bajo circunstancias normales,

continuará diferenciándose en un tipo de célula específica o subconjunto de tipos de células, y no puede, bajo circunstancias normales, diferenciarse en un tipo de célula diferente o invertirse a un tipo de célula menos diferenciada. La “des-diferenciación” se refiere al proceso por el que una célula invierte a una posición menos especializada (o comprometida) dentro del linaje de una célula. Como se usa en el presente documento, el “linaje” de una célula define la herencia de la célula, es decir, de qué células procede y a qué células puede dar lugar. El linaje de una célula pone la célula dentro de un esquema de herencia de desarrollo y diferenciación.

En un amplio sentido, una “célula progenitora” es una célula que tiene la capacidad para crear progenie que está más diferenciada que ella misma, y aún retiene la capacidad para reponer el conjunto de progenitores. Por esa definición, los propios citoblastos también son células progenitoras, ya que son los precursores más inmediatos a las células terminalmente diferenciadas. Cuando se refiere a las células de la presente invención, como se describe en mayor detalle más adelante, puede usarse esta amplia definición de célula progenitora. En un sentido más estricto, una célula progenitora se define frecuentemente como una célula que es el producto intermedio en la ruta de diferenciación, es decir, se produce a partir de un citoblasto y es el producto intermedio en la producción de un tipo de célula madura o subconjunto de tipos de células. Este tipo de célula progenitora generalmente no puede auto-renovarse. Por consiguiente, si se hace referencia a este tipo de célula en el presente documento, se denominará en lo sucesivo una “célula progenitora de no renovación” o un “progenitor intermedio o célula precursora”.

Se usan varios términos en el presente documento con respecto al trasplante de células o tejido o terapia de sustitución de células. Los términos “transferencia autóloga”, “trasplante autólogo”, “autoinjerto” y similares se refieren a tratamientos en los que el donante de las células o trasplante también es el receptor de las células o trasplante. Los términos “transferencia alógena”, “trasplante alógeno”, “aloinjerto” y similares se refieren a tratamientos en los que el donante de las células o trasplante es de la misma especie que el receptor, pero no es el mismo individuo. Una transferencia de células en la que las células del donante coinciden histocompatiblemente con un receptor se denomina algunas veces una “transferencia singénica”. Los términos “transferencia xenogénica”, “trasplante xenogénico”, “xenoinjerto” y similares se refieren a tratamientos en los que el donante de las células o trasplante es de una especie diferente de la del receptor.

Como se usa en el presente documento, el término “célula neural” incluye tanto células nerviosas (es decir, neuronas, por ejemplo, neuronas uni-, bi- o multipolares) como sus precursores y células de la glía (por ejemplo, macroglía tal como oligodendrocitos, células de Schwann, y astrocitos, o microglía) y sus precursores.

Las células usadas en la presente invención se denominan generalmente “células postparto” o “células derivadas del postparto” (PPDC(s)). Las células son más específicamente “células derivadas del umbilical” o “células derivadas del cordón umbilical” (UDC(s)), o “células derivadas de tejido del cordón umbilical” (UTC(s)). Además, las células pueden describirse como que son células madre o progenitoras, siendo el último término usado en el sentido amplio. El término “derivadas” se usa para indicar que las células han sido obtenidas de su fuente biológica y cultivadas o manipuladas de otro modo *in vitro* (por ejemplo, cultivadas en un medio de crecimiento para expandir la población y/o para producir una línea celular). Las manipulaciones *in vitro* de citoblastos umbilicales y las características únicas de las células derivadas del umbilical de la presente invención se describen en detalle más adelante.

El término “aislada”, como se usa en el presente documento, se refiere generalmente a una célula que se ha separado de su entorno natural. Este término incluye separación física macroscópica de su entorno natural, por ejemplo, extracción del animal donante. En realizaciones preferidas, una célula aislada no está presente en un tejido, es decir, la célula se separa o se disocia de las células vecinas con las que está normalmente en contacto. Preferentemente, las células se administran como una suspensión de células. Como se usa en el presente documento, el término “suspensión de células” incluye células que están en contacto con un medio y que se han disociado, por ejemplo, sometiendo un trozo de tejido a trituración suave.

Como se usa en el presente documento, el término “medio de crecimiento” generalmente se refiere a un medio suficiente para el cultivo de células derivadas de tejido del cordón umbilical. En particular, un medio para el cultivo de las células de la invención comprende medio esencial modificado por Dulbecco (DMEM). Particularmente se prefiere DMEM-baja glucosa (DMEM-LG) (Invitrogen, Carlsbad, Ca.). DMEM-LG se complementa preferentemente con suero, lo más preferentemente suero bovino fetal o suero humano. Normalmente se añade 15 % (v/v) de suero bovino fetal (por ejemplo, suero bovino fetal definido, Hyclone, Logan Ut.) junto con antibióticos/antimicóticos (preferentemente 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 miligramos/mililitro de estreptomicina y 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina B; Invitrogen, Carlsbad, Ca.) y 0,001 % (v/v) de 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis Mo.). En algunos casos se usan medios de crecimiento diferentes o se proporcionan suplementaciones diferentes, y éstos normalmente se indican en el texto como suplementaciones al medio de crecimiento. En ciertos medios químicamente definidos, las células pueden cultivarse absolutamente sin suero presente. En tales casos, las células pueden requerir ciertos factores de crecimiento, que pueden añadirse al medio para soportar y sostener las células. Los factores actualmente preferidos que van a añadirse para el crecimiento en medio sin suero incluyen uno o más de bFGF, EGF, IGF-I y PDGF. En realizaciones más preferidas, dos, tres o los cuatro factores se añaden a medio sin suero o químicamente definido. En otras realizaciones, LIF se añade a medio sin suero para soportar o mejorar el crecimiento de las células.

El término “línea celular” se refiere generalmente a una población de células formada por uno o más subcultivos de un cultivo celular primario. Cada ronda de subcultivo se denomina un pase. Si las células se subcultivan, se denomina que “se han sometido a pases”. Una población de células específica, o una línea celular, se refiere algunas veces o se caracteriza por el número de veces que se ha sometido a pases. Por ejemplo, una población de células cultivadas que se ha sometido a pases diez veces puede denominarse un cultivo P10. El cultivo primario, es decir, el primer cultivo tras el aislamiento de células del tejido, se designa P0. Tras el primer subcultivo, las células se describen como un cultivo secundario (P1 o pase 1). Después del segundo subcultivo, las células son un cultivo terciario (P2 o pase 2), etc. Se entenderá por aquellos expertos en la materia que puede haber mucho duplicados de poblaciones durante el periodo de pases; por tanto, el número de duplicados de poblaciones de un cultivo es mayor que el número de pase. La expansión de células (es decir, el número de duplicados de poblaciones) durante el periodo entre pases depende de muchos factores, que incluyen, pero no se limitan a, la densidad de siembra, sustrato, medio, condiciones de crecimiento y tiempo entre pases.

Los términos “vehículo farmacéuticamente aceptable” o “medio farmacéuticamente aceptable”, que pueden usarse intercambiamente con los términos “vehículo biológicamente compatible” o “medio biológicamente compatible”, generalmente se refieren a reactivos, células, compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que no solo son compatibles con las células y otros agentes que van a administrarse terapéuticamente, sino que también son adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otra complicación proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable. Como se describe en mayor detalle en el presente documento, vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para su uso en la presente invención incluyen líquidos, materiales semisólidos (por ejemplo, geles) y sólidos (por ejemplo, andamiajes y matrices de células, tubos, hojas y otros materiales tales conocidos en la técnica y descritos en mayor detalle en el presente documento). Estos materiales semisólidos y sólidos pueden diseñarse para resistir a la degradación dentro del cuerpo (no biodegradables) o pueden diseñarse para degradarse dentro del cuerpo (biodegradables, bioerosionables). Un material biodegradable puede ser adicionalmente biorresorbible o bioabsorbible, es decir, puede disolverse y absorberse en fluidos corporales (los implantes solubles en agua son un ejemplo), o degradarse y eliminarse por último lugar del cuerpo, tanto por conversión en otros materiales como rotura y eliminación a través de rutas naturales. La tasa de biodegradación puede variar según la tasa de liberación deseada una vez implantado en el cuerpo.

El término “matriz”, como se usa en el presente documento, generalmente se refiere a materiales biodegradables y/o biorresorbibles que se administran con las células a un paciente. La matriz puede actuar de andamio temporal hasta que se sustituye por células nuevamente crecidas. En algunas realizaciones, la matriz puede proporcionar la liberación sostenida de factores neurotróficos u otros agentes usados conjuntamente con las células, y puede proporcionar una estructura para desarrollar el crecimiento de tejido en el paciente. En otras realizaciones, la matriz simplemente proporciona un andamio temporal para el desarrollo de tejido. La matriz puede estar en forma particulada (macropartículas superiores a 10 micrómetros de diámetro o micropartículas inferiores a 10 micrómetros de diámetro), o puede estar en forma de un implante tridimensional estructuralmente estable (por ejemplo, un andamio). La matriz puede ser una suspensión, hidrogel o alternativamente una estructura tridimensional tal como un cubo, cilindro, tubo, bloque, película, hoja o una forma anatómica apropiada.

El término “andamio”, como se usa en el presente documento, generalmente se refiere a una estructura porosa tridimensional que proporciona un molde para el crecimiento celular. Un andamio está hecho de materiales biodegradables y/o biorresorbibles que se degradan con el tiempo dentro del cuerpo. La duración de tiempo necesaria para que el andamio se degrade puede depender del peso molecular de los materiales. Así, material de mayor peso molecular puede producir andamiajes de polímero que retienen su integridad estructural durante periodos de tiempo más largos; mientras que menores pesos moleculares producen tanto liberación más lenta como vidas de los andamiajes más cortas. El andamio puede prepararse mediante cualquier medio conocido en la técnica. Ejemplos de polímeros que pueden usarse para formar el andamio incluyen polímeros naturales y sintéticos.

En algunas realizaciones de la invención, el andamio puede infundirse con, recubrirse con o comprender una población de células, factores de crecimiento u otros nutrientes para promover el crecimiento celular. En algunas realizaciones preferidas, el andamio contiene agentes inductores del crecimiento que incluyen neurotrofinas. Además, los agentes inductores del crecimiento pueden ser sintéticos o producirse naturalmente, y pueden ser un fragmento, derivado o análogo de un agente inductor del crecimiento.

“Factor neurotrófico” o “factor trófico” se definen como una sustancia que promueve la supervivencia, crecimiento, proliferación y/o maduración de una célula, o estimula la elevada actividad de una célula.

REALIZACIONES ESPECÍFICAS

En sus diversas realizaciones descritas en el presente documento, la presente invención caracteriza composiciones farmacéuticas para el tratamiento de dolor crónico y neuropático. Estas composiciones farmacéuticas se diseñan para estimular y soportar o curar el crecimiento de tejido neural, y para mejorar la regeneración y reparación de tejidos que rodean el tejido neural, que incluyen, pero no se limitan a, tejido dérmico, tejido vascular, tejido

conjuntivo, cartílago, tejido adiposo, tejido de músculo, tendones o ligamentos.

Las células de la invención incluyen células progenitoras y poblaciones de células derivadas de tejido umbilical. Una explicación más detallada de células preferidas puede encontrarse a continuación.

Células

La descripción del aislamiento y caracterización de las células preferidas de la invención se describen en las publicaciones de patente de EE.UU. nº 2005/0032209, 2005/0058631 y 2005/0054098.

En algunas realizaciones, las células son citoblastos. Los citoblastos son células no diferenciadas definidas por la capacidad de una única célula tanto para auto-renovarse como para diferenciarse para producir células de progenie, que incluyen progenitores de auto-renovación, progenitores de no renovación y células terminalmente diferenciadas.

Los citoblastos son células derivadas de tejido del cordón umbilical. Para aislar las células derivadas de tejido del cordón umbilical, un cordón umbilical se recupera tras o poco después del término de tanto un embarazo a término como antes de término, por ejemplo, después de la expulsión de después del parto. El tejido del cordón umbilical puede transportarse desde el sitio del parto hasta un laboratorio en un recipiente estéril tal como un matraz, vaso de precipitados, placa de cultivo o bolsa. El recipiente puede tener una disolución o medio, que incluye, pero no se limita a, una solución salina, tal como medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (también conocido como medio esencial mínimo de Dulbecco) o solución salina tamponada con fosfato (PBS), o cualquier disolución usada para el transporte de órganos usados para trasplante, tal como disolución de la Universidad de Wisconsin o disolución perfluoroquímica. Pueden añadirse uno o más antibióticos y/o antimicóticos, tales como, pero no se limitan a, penicilina, estreptomicina, anfotericina B, gentamicina y nistatina, al medio o tampón. El tejido del cordón umbilical puede aclararse con una disolución anticoagulante tal como disolución que contiene heparina. Es preferible mantener el tejido a aproximadamente 4 a aproximadamente 10 °C antes de la extracción de las células. Es incluso más preferible que el tejido no se congele antes de la extracción de las células.

Las células derivadas de tejido del cordón umbilical se aíslan preferentemente en un entorno aséptico. El cordón umbilical puede separarse de la placenta por medios conocidos en la técnica. La sangre y los residuos se eliminan preferentemente del tejido postparto antes del aislamiento de las células derivadas de tejido del cordón umbilical. Por ejemplo, el tejido postparto puede lavarse con disolución de tampón, que incluye, pero no se limita a, solución salina tamponada con fosfato. El tampón de lavado también puede comprender uno o más antimicóticos y/o antibióticos, que incluyen, pero no se limitan a, penicilina, estreptomicina, anfotericina B, gentamicina y nistatina.

El tejido postparto que comprende un umbilical completo o un fragmento o sección del mismo se disgrega preferentemente por fuerza mecánica (troceando o fuerzas de cizallamiento). En una realización actualmente preferida, el procedimiento de aislamiento también puede utilizar un procedimiento enzimático de digestión. Se conocen muchas enzimas en la técnica por ser útiles para el aislamiento de células individuales de matrices de tejido complejas para facilitar el crecimiento en cultivo. Las enzimas de digestión oscilan de débilmente digestivas (por ejemplo, desoxirribonucleasas y la proteasa neutra, dispasa) a fuertemente digestivas (por ejemplo, papaína y tripsina), y están comercialmente disponibles. Una lista no exhaustiva de tales enzimas incluye actividades de enzimas mucolíticas, metaloproteasas, proteasas neutras, serina proteasas (tales como tripsina, quimotripsina o elastasa) y desoxirribonucleasas. Actualmente se prefieren actividades de enzimas seleccionadas de metaloproteasas, proteasas neutras y actividades mucolíticas. Por ejemplo, las colagenasas son conocidas por ser útiles para aislar diversas células de tejidos. Las desoxirribonucleasas pueden digerir ADN monocatenario y pueden minimizar el aglutinamiento de células durante el aislamiento. Procedimientos preferidos implican tratamiento enzimático con colagenasa y dispasa, o colagenasa, dispasa e hialuronidasa. El experto apreciará que muchos de tales tratamientos enzimáticos son conocidos en la técnica para aislar células de diversas fuentes de tejido, y está bien preparado para evaluar enzimas nuevas o adicionales o combinaciones de enzimas para su utilidad en aislar las células de la invención. Tratamientos enzimáticos preferidos pueden ser de aproximadamente 0,5 a 2 horas de duración o más. En otras realizaciones preferidas, el tejido se incuba a 37 °C durante el tratamiento enzimático de la etapa de disociación.

Procedimientos para la selección del medio de cultivo más apropiado, preparación de medios y técnicas de cultivo celular son muy conocidos en la técnica y se describen en una variedad de fuentes, que incluyen Doyle y col., (eds.), 1995, Cell & Tissue Culture Laboratory Procedures, John Wiley & Sons, Chichester; y Ho y Wang (eds.), 1991, Animal Cell Bioreactors, Butterworth-Heinemann, Boston.

En algunas formas de la invención, las células se someten a pases o se sacan a un recipiente de cultivo separado que contiene medio fresco del mismo tipo o uno diferente al que se usa inicialmente, en el que la población de células puede expandirse mitóticamente. Las células de la invención pueden usarse en cualquier momento entre el pase 0 y la senescencia. Las células se someten a pases preferentemente entre aproximadamente 3 y aproximadamente 25 veces, más preferentemente se someten a pases aproximadamente 4 a aproximadamente 12 veces y preferentemente se someten a pases 10 u 11 veces. La clonación y/o subclonación pueden realizarse para confirmar que se ha aislado una población de células clónicas.

En algunos aspectos de la invención, los diferentes tipos de células presentes en tejido postparto se fraccionan en subpoblaciones de las que pueden aislarse las células derivadas de tejido del cordón umbilical. El fraccionamiento o selección puede llevarse a cabo usando técnicas estándar para la separación de células. Tales técnicas incluyen, pero no se limitan a, tratamiento enzimático para disociar tejido postparto en sus células componentes, seguido de clonación y selección de tipos de células específicos, que incluye, pero no se limitan a, selección basada en marcadores morfológicos y/o bioquímicos; crecimiento selectivo de células deseadas (selección positiva), destrucción selectiva de células no deseadas (selección negativa); separación basada en la aglutinabilidad de células diferenciales en la población mixta como, por ejemplo, con aglutinina de soja; procedimientos de congelación-descongelación; propiedades de adherencia diferencial de las células en la población mixta; filtración; centrifugación convencional y zonal; elutriación centrífuga (centrifugación en contracorriente); separación por gravedad unitaria; distribución en contracorriente; electroforesis; y citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS).

El medio de cultivo se cambia según sea necesario. Por ejemplo, aspirando cuidadosamente el medio de la placa con una pipeta y reponiendo con medio fresco. La incubación continúa hasta que se acumula un número o densidad suficiente de células en la placa. Después, cualquier sección de tejido de explante original que exista puede eliminarse y las células restantes separarse de la placa por tripsinización usando técnicas estándar o usando un raspador de células. Después de la tripsinización las células se recogen, se sacan a medio fresco y se incuban como antes. En algunas realizaciones, el medio se cambia al menos una vez aproximadamente 24 horas después de la tripsinización para eliminar cualquier célula flotante. Se considera que las células restantes en cultivo son células derivadas de tejido del cordón umbilical.

Las células derivadas de tejido del cordón umbilical pueden criopreservarse. Por consiguiente, en una realización preferida descrita en mayor detalle más adelante, las células derivadas de tejido del cordón umbilical para transferencia autóloga (para tanto la madre como el niño) pueden derivarse de tejidos postparto apropiados tras el parto de un niño, luego criopreservarse de manera que estén disponibles en el caso de que se necesiten después para trasplante.

Las células derivadas de tejido del cordón umbilical pueden caracterizarse, por ejemplo, por características de crecimiento (por ejemplo, capacidad de duplicación de la población, tiempo de duplicación, pases hasta la senescencia), análisis de cariotipo (por ejemplo, cariotipo normal; linaje materno o neonatal), citometría de flujo (por ejemplo, análisis FACS), inmunohistoquímica y/o inmunocitoquímica (por ejemplo, para la detección de epítopes), pauta de expresión génica (por ejemplo, matrices de chips de genes; reacción en cadena de la polimerasa (por ejemplo, PCR con transcriptasa inversa, PCR en tiempo real y PCR convencional)), matrices de proteína, secreción de proteínas (por ejemplo, por ensayo de coagulación de plasma o análisis de medio acondicionado con PDC, por ejemplo, por enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA), reacción linfocitaria mixta (por ejemplo, como medida de estimulación de CMSP), y/u otros procedimientos conocidos en la técnica.

Ejemplos de células derivadas de tejido del cordón umbilical se depositaron en la Colección Americana de Cultivos Tipo el 10 de junio de 2004, y se les asignaron los siguientes números de acceso ATCC: (1) a la designación de cepa UMB 022803 (P7) se le asignó el nº de acceso PTA-6067; y (2) a la designación de cepa UMB 022803 (P17) se le asignó el nº de acceso PTA-6068.

En diversas realizaciones, las células derivadas de tejido del cordón umbilical poseen una o más de las siguientes características de crecimiento: (1) requieren L-valina para el crecimiento en cultivo; (2) pueden crecer en atmósferas que contienen oxígeno de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 20 %; (3) tienen el potencial de al menos aproximadamente 40 duplicaciones en cultivo antes de alcanzar la senescencia; y (4) se unen y expanden en recipientes de cultivo de tejido que están sin recubrir o que están recubiertos con gelatina, laminina, colágeno, poliornitina, vitronectina o fibronectina.

En ciertas realizaciones, las células derivadas de tejido del cordón umbilical poseen un cariotipo normal, que se mantiene a medida que las células se someten a pases. Están disponibles procedimientos de cariotipado y son conocidos para aquellos expertos en la materia.

En otras realizaciones, las células derivadas de tejido del cordón umbilical pueden caracterizarse por la producción de ciertas proteínas, que incluyen: (1) producción de al menos uno de factor tisular, vimentina y alfa-actina de músculo liso; y (2) producción de al menos uno de: marcadores de la superficie celular CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, PD-L2 y HLA-A,B,C, como se detectan por citometría de flujo. En otras realizaciones, las células derivadas de tejido del cordón umbilical se caracterizan/pueden caracterizarse por carecer de la producción de al menos uno de: marcadores de la superficie celular CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G y HLA-DR,DP,DQ, como se detectan por citometría de flujo. En algunas aplicaciones se prefieren particularmente células que producen al menos dos de: factor tisular; vimentina; y alfa-actina de músculo liso. Son más preferidas aquellas células que producen las tres proteínas: factor tisular; vimentina; y alfa-actina de músculo liso.

En otras realizaciones, las células derivadas de tejido del cordón umbilical pueden caracterizarse por expresión génica con respecto a una célula humana que es un fibroblasto, un citoblasto mesenquimatoso o una célula de médula ósea de la cresta ilíaca, que es elevada para un gen que codifica al menos uno de: interleucina 8; reticulón 1; ligando 1 de quimiocina (motivo C-X-C) (actividad estimulante del crecimiento de melanoma, alfa); ligando 6 de quimiocina (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica de granulocitos); ligando 3 de quimiocina (motivo C-X-C); y factor de necrosis tumoral, alfa-proteína 3 inducida.

En todavía otras realizaciones, las células derivadas de tejido del cordón umbilical pueden caracterizarse por expresión génica con respecto a una célula humana que es un fibroblasto, un citoblasto mesenquimatoso o una célula de médula ósea de la cresta ilíaca, que es reducida para un gen que codifica al menos uno de: homeocaja 2 de baja estatura; proteína 2 de 27 kDa de choque térmico; ligando 12 de quimiocina (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células del estroma); elastina (estenosis aórtica supravulvar, síndrome de Williams-Beuren); ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); homeocaja 2 de mesénquima (homeocaja específica de la parada del crecimiento); homólogo 1 de la homeocaja de *sine oculis* (*Drosophila*); cristalina, alfa B; activador asociado a dishevelled de la morfogénesis 2; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralina 1; tetranectina (proteína de unión a plasminógeno); homología tres de src (SH3) y dominio rico en cisteína; colesterol 25-hidroxilasa; factor de transcripción 3 relacionado con enanismo; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de la procolágeno C-endopeptidasa; homólogo 7 frizzled (*Drosophila*); gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C (hexabraquina); proteína 5 de la homeocaja iroquesa; hefaestina; integrina, beta 8; glucoproteína 2 de vesículas sinápticas; neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; proteína 2 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, 36 kDa; ADNc de *Homo sapiens* FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor 1 similar a receptores de citocinas; canal activado por calcio de conductancia intermedia/pequeña de potasio, subfamilia N, miembro 4; integrina, beta 7; co-activador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ); homólogo 2 de la homeocaja de *sine oculis* (*Drosophila*); proteína KIAA1034; proteína 5 de membrana asociada a vesícula (miobrevina); proteína 1 de la matriz extracelular similar a fibulina que contiene EGF; respuesta 3 de crecimiento temprano; homeocaja 5 de distal-less; proteína hipotética FLJ20373; familia 1 de la aldo-ceto reductasa, miembro C3 (3-alfa hidroxisteroide deshidrogenasa, tipo II); biglicano; co-activador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ); fibronectina 1; proencefalina; integrina, beta similar a 1 (con dominios de repetición similares a EGF); clon de ADNc de inserto de longitud completa de ARNm de *Homo sapiens* EUROIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor C de péptido natriurético/guanilato ciclasa C (receptor C de péptido natriurético); proteína hipotética FLJ14054; ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222); similar a la proteína 3 de interacción con BCL2/adenovirus E1B de 19 kDa; proteína 1 de unión a AE; y/o polipéptido 1 de la subunidad VIIa de citocromo c oxidasa (músculo).

En otras realizaciones, las células derivadas de tejido del cordón umbilical pueden caracterizarse por secreción de al menos uno de: MCP-1; IL-6; IL-8; GCP-2; HGF; KGF; FGF; HB-EGF; BDNF; TPO; RANTES; MIP1b; 1309; MDC; y TIMP1. En algunas realizaciones, las células derivadas de tejido del cordón umbilical pueden caracterizarse por una ausencia de secreción de al menos uno de: TGF-beta2; ANG2; MIP1a; PDGFbb; y VEGF, como se detectan por ELISA.

Las células derivadas de tejido del cordón umbilical se derivan de tejido del cordón umbilical sustancialmente libre de sangre y son capaces de auto-renovación y expansión en cultivo. Pueden requerir L-valina para el crecimiento, pueden crecer en al menos aproximadamente 5 % de oxígeno y comprender al menos una de las siguientes características: (1) el potencial de al menos aproximadamente 40 duplicaciones en cultivo; (2) la capacidad para unirse y expandirse sobre un recipiente de cultivo de tejido no recubierto o uno recubierto con gelatina, laminina, colágeno, poliornitina, vitronectina o fibronectina; (3) producción de vimentina y alfa-actina de músculo liso; (4) producción de CD10, CD13, CD44, CD73 y CD90; y (5) expresión de un gen, que con respecto a una célula humana que es un fibroblasto, un citoblasto mesenquimatoso o una célula de médula ósea de la cresta ilíaca, es elevada para un gen que codifica interleucina 8 y reticulón 1. Tales células derivadas de tejido del cordón umbilical pueden opcionalmente no producir CD45 y son negativas para CD117.

En realizaciones preferidas, la célula comprende dos o más de crecimiento, producción de proteína/marcador de superficie, expresión génica o características de secreción de sustancias anteriormente enumerados. Son más preferidas aquellas células que comprenden tres, cuatro, cinco o más de las características. Son todavía más preferidas las células derivadas de tejido del cordón umbilical que comprenden seis, siete, ocho o más de las características. Actualmente son todavía más preferidas aquellas células que comprenden todas las características anteriores.

Entre las células que se prefieren actualmente para su uso con la invención en varios de sus aspectos están las células derivadas de tejido del cordón umbilical que tienen las características que se han descrito anteriormente y más particularmente aquellas en las que las células tienen cariotipos normales y mantienen cariotipos normales con pases, y adicionalmente en las que las células expresan cada uno de los marcadores CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, y en las que las células producen las proteínas inmunológicamente detectables que se corresponden con los marcadores enumerados. Todavía son más preferidas aquellas células que, además de lo anterior, no producen proteínas correspondientes a ninguno de los marcadores CD31, CD34, CD45, CD141 o HLA-DR,DP,DQ, como se detecta por citometría de flujo.

Ciertas células que tienen el potencial de diferenciarse a lo largo de las líneas que conducen a diversos fenotipos son inestables y así pueden diferenciarse espontáneamente. Células actualmente preferidas para su uso con la invención son aquellas que no se diferencian espontáneamente, por ejemplo, a lo largo de mioblasto, músculo esquelético, músculo liso vascular, pericito, líneas endoteliales hemangiogénicas, angiogénicas, vasculogénicas o vasculares. Las células preferidas, cuando se cultivan en medio de crecimiento, son sustancialmente estables con respecto a los marcadores de células producidos sobre su superficie, y con respecto al patrón de expresión de diversos genes, por ejemplo, como se determina usando una prueba de diagnóstico médico comercializada bajo el nombre comercial GENECHIP (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA). Las células siguen siendo sustancialmente constantes, por ejemplo, en sus características de marcador superficial con los pases y a través de múltiples duplicaciones de poblaciones.

Otro aspecto proporcionado por la invención caracteriza el uso de poblaciones de las células derivadas de tejido del cordón umbilical descritas anteriormente. En algunas realizaciones, la población de células es heterogénea. Una población de células heterogénea de la invención puede comprender al menos aproximadamente el 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o el 95 % de células derivadas de tejido del cordón umbilical de la invención. Las poblaciones de células heterogéneas de la invención pueden comprender además citoblastos u otras células progenitoras, tales como mioblastos u otras células progenitoras de músculo, hemangioblastos o células precursoras de vasos sanguíneos; o pueden comprender además células de músculo esquelético completamente diferenciadas, células de músculo liso, pericitos o células endoteliales de vasos sanguíneos. En algunas realizaciones, la población es sustancialmente homogénea, es decir, comprende sustancialmente solo células derivadas de tejido del cordón umbilical (preferentemente al menos aproximadamente el 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de las células derivadas de tejido del cordón umbilical). La población de células homogénea de la invención puede comprender células derivadas del umbilical. Las poblaciones de células derivadas del umbilical homogéneas están preferentemente libres de células de linaje materno. La homogeneidad de una población de células puede lograrse por cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, por clasificación de células (por ejemplo, citometría de flujo) o por expansión clónica según procedimientos conocidos. Así, poblaciones de células derivadas de tejido del cordón umbilical homogéneas preferidas pueden comprender una línea celular clónica de células derivadas de tejido del cordón umbilical. Tales poblaciones son particularmente útiles cuando se ha aislado un clon de célula con funcionalidad altamente deseable.

En una realización, las células son células derivadas de tejido del cordón umbilical que se administran como células no diferenciadas, es decir, como cultivadas en medio de crecimiento. Alternativamente, las células derivadas de tejido del cordón umbilical pueden administrarse tras la exposición en cultivo a condiciones que estimulan la diferenciación hacia un tejido neural deseado. En una realización preferida, las células son UTC. En otra realización, las células son hUTC.

Además, la población de células puede incluir más de un tipo de célula. De hecho, algunas realizaciones incluyen la administración de células que rodean y soportan la célula neural. Tales células pueden incluir, pero no se limitan a, tejido dérmico, tejido vascular, tejido conjuntivo, cartílago, tejido adiposo, tejido de músculo, tendones o ligamentos.

El protocolo general, aislamiento y caracterización de una célula derivada de tejido del cordón umbilical puede encontrarse en los Ejemplos 5-15.

Células genéticamente modificadas

Las células usadas en la invención también pueden ser modificadas genéticamente para producir productos génicos terapéuticamente útiles, para producir agentes para facilitar o soportar la formación de tejido neural, curación y/o crecimiento, o para producir factores para reclutar células progenitoras al área de daño neural.

La modificación genética puede llevarse a cabo usando cualquiera de una variedad de vectores que incluyen, pero no se limitan a, vectores virales integrantes, por ejemplo, vector de retrovirus o vectores de virus adeno-asociados; vectores replicantes no integrantes, por ejemplo, vectores del virus del papiloma, vectores de SV40, vectores adenovirales; o vectores virales defectuosos en la replicación. Otros procedimientos de introducción de ADN en células incluyen el uso de liposomas, electroporación, una pistola de partículas, o por inyección de ADN directa.

Por ejemplo, las células pueden manipularse genéticamente para expresar y/o secretar una molécula exógena (por ejemplo, una molécula heteróloga normalmente no producida por la célula) o para modificar la producción de una molécula para tratar dolor crónico. Tales moléculas pueden producirse por las células tras la introducción de moléculas de ácidos nucleicos heterólogos usando técnicas que son muy conocidas en la técnica.

En una realización, las células de la invención pueden modificarse para expresar un receptor para un neurotransmisor. En otra realización, las células de la invención se modifican para producir un neurotransmisor, que incluye, pero no se limita a, serotonina, histamina, ácido gamma-aminobutírico, glutamato, aspartato, glicina, neuropéptido Y, ATP, GRP, adenosina, epinefrina, neuroepinefrina, dopamina, acetilcolina, melatonina, n-acetilaspargilglutamato, octopamina, tiramina, gastrina, colecitoquinina, vasopresina, oxitocina, neurofisina I y II,

polipéptido pancreático, péptido YY, corticotropina, dinorfina, endorfina, encefalina, secretina, motilina, glucagones, péptido intestinal vasoactivo, factor liberador de hormona del crecimiento, somatostatina, neuroquinina A y B, sustancia P, bombesina, péptido liberador gástrico, óxido nítrico, monóxido de carbono y anandamida. En otra realización más, las células de la invención se modifican para producir un fragmento de un neurotransmisor, que incluye, pero no se limita a, un fragmento del extremo C o extremo N.

En otra realización, una molécula exógena potencia la capacidad neurorregenerativa de las células trasplantadas, ayuda en el restablecimiento de la comunicación sensorineural de interneuronas de GABA y/o ayuda en el restablecimiento del equilibrio de neurotransmisores excitadores/inhibidores en el sujeto

En otra realización más, las células se manipulan genéticamente para expresar y/o secretar moléculas exógenas que reducen directamente el dolor en el sujeto, promueven el éxito del trasplante (por ejemplo, por modulación por disminución de una respuesta inmunitaria en el sujeto) y/o promueven la supervivencia o función de las células trasplantadas. Moléculas a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, un factor neurotrófico o un agente neuroprotector.

En otra realización más, células no modificadas o modificadas pueden introducirse junto con otros tipos de células genéticamente modificadas para realizar una función útil. Por ejemplo, con el fin de promover el crecimiento de neuronas, las células pueden administrarse junto con otras células que secretan o han sido modificadas para secretar, por ejemplo, un factor neurotrófico. Ejemplos de células que actúan de vehículos de transgenes para un sujeto incluyen fibroblastos, células cromafines suprarrenales, astrocitos y mioblastos. Tales células, por ejemplo fibroblastos y células de la glía, también pueden usarse para administrar retrovirus que contienen genes tales como el gen timidina cinasa del herpes simple, cuyos productos génicos son dianas para otros fármacos terapéuticos o agentes tales como ganciclovir para células diana.

Las células huésped pueden transformarse o transfectarse con ADN controlado por, o en asociación operativa con, uno o más elementos de control de la expresión apropiados tales como secuencias promotoras o potenciadoras, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, entre otros, y un marcador de selección. Cualquier promotor puede usarse para accionar la expresión del gen insertado. Por ejemplo, los promotores virales incluyen, pero no se limitan a, un promotor del CMV/potenciador, SV 40, virus del papiloma, virus de Epstein-Barr o promotor del gen elastina. En algunas realizaciones, los elementos de control usados para controlar la expresión del gen de interés pueden permitir la expresión regulada del gen de manera que el producto se sintetice solo cuando se necesite *in vivo*. Si se desea expresión transitoria, se usan promotores constitutivos preferentemente en un vector no integrante y/o defectuoso en la replicación. Alternativamente, podrían usarse promotores inducibles para accionar la expresión del gen insertado cuando sea necesario. Promotores inducibles incluyen, pero no se limitan a, aquellos asociados a metalotioneína y proteínas de choque térmico.

Tras la introducción del ADN exógeno, puede permitirse que las células manipuladas crezcan en medios enriquecidos y luego cambiarlas a medios selectivos. El marcador de selección en el ADN exógeno confiere resistencia a la selección y permite que las células integren establemente el ADN exógeno como, por ejemplo, sobre un plásmido, en sus cromosomas y crezcan para formar focos que, a su vez, pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este procedimiento puede usarse ventajosamente para manipular líneas celulares que expresan el producto génico.

Las células de la invención pueden manipularse genéticamente para "inactivar" o "silenciar" la expresión de factores que promueven la inflamación o rechazo en el sitio del implante. Técnicas de modulación negativa para la reducción de los niveles de expresión de genes diana o niveles de actividad de productos de genes diana se tratan más adelante. "Modulación negativa", como se usa en el presente documento, se refiere a una reducción en el nivel y/o actividad del producto de gen diana con respecto al nivel y/o actividad del producto de gen diana en ausencia del tratamiento modulador. La expresión de un gen nativo para una célula de músculo esquelético, célula de músculo liso vascular, pericito, célula endotelial vascular, célula neural, o células progenitoras de los mismos, puede reducirse o inactivarse usando varias técnicas que incluyen, por ejemplo, inhibición de la expresión por inactivación del gen usando la técnica de recombinación de homólogos. Normalmente, un exón que codifica una región importante de la proteína (o un exón 5' para esa región) se interrumpe por un marcador de selección positivo, por ejemplo, neo, que previene la producción de ARNm normal del gen diana y que produce la inactivación del gen. Un gen también puede inactivarse creando una delección en parte de un gen, o deleccionando el gen entero. Usando una construcción con dos regiones de homología con el gen diana que están muy alejadas en el genoma, las secuencias que intervienen en las dos regiones pueden deleccionarse (Mombaerts y col., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1991; 88:3084). También pueden usarse antisentido, ADNzimas, ribozimas, ARN interferente pequeño (ARNip) y otras moléculas tales que inhiben la expresión del gen diana para reducir el nivel de actividad del gen diana. Por ejemplo, se ha mostrado que moléculas de ARN antisentido que inhiben la expresión de complejos del gen mayor de histocompatibilidad (HLA) son las más versátiles con respecto a las respuestas inmunitarias. Todavía además, pueden utilizarse moléculas de triple hélice en la reducción del nivel de actividad del gen diana. Estas técnicas se describen en detalle por Davis, L.G. y col. (eds), Basic Methods in Molecular Biology, 2ª ed., 1994, Appleton & Lange, Norwalk, Ct.

En otros aspectos, la divulgación implica el uso de lisados celulares y fracciones solubles de células preparadas a

partir de una célula derivada de tejido del cordón umbilical (no reivindicado). Tales lisados y fracciones de los mismos tienen muchas utilidades. El uso de tales fracciones solubles del lisado (es decir, sustancialmente libres de membranas) *in vivo*, por ejemplo, permite que el medio intracelular beneficioso se use alogénicamente en un paciente sin introducir una cantidad apreciable de las proteínas de la superficie celular que lo más probablemente provoquen el rechazo, u otras respuestas inmunológicas adversas. Los procedimientos de lisado de células son muy conocidos en la técnica e incluyen diversos medios de rotura mecánica, rotura enzimática o rotura química, o combinaciones de los mismos. Tales lisados celulares pueden prepararse a partir de células directamente en su medio de crecimiento, y así contener factores de crecimiento secretados y similares, o pueden prepararse a partir de células lavadas libres de medio en, por ejemplo, PBS u otra disolución. Las células lavadas pueden resuspenderse a concentraciones superiores a la densidad de población original, si se prefiere.

En una opción se preparan lisados de células completas, por ejemplo, rompiendo células sin posterior separación de las fracciones celulares. En otra opción, una fracción de membrana celular se separa de una fracción soluble de las células por procedimientos rutinarios conocidos en la técnica, por ejemplo, centrifugación, filtración, o procedimientos similares.

Los lisados celulares o fracciones solubles de células preparadas a partir de las poblaciones de células derivadas del postparto pueden usarse como tales, adicionalmente concentrarse por, por ejemplo, ultrafiltración o liofilización, o incluso secarse, purificarse parcialmente, combinarse con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables como se conoce en la técnica, o combinarse con otros compuestos tales como productos biológicos, por ejemplo, composiciones de proteína farmacéuticamente útiles. Los lisados celulares o fracciones de los mismos pueden usarse *in vitro* o *in vivo*, solos o, por ejemplo, con células vivas autólogas o singénicas. Los lisados, si se introducen *in vivo*, pueden introducirse localmente en un sitio de tratamiento, o remotamente para proporcionar, por ejemplo, factores de crecimiento celular necesarios para un paciente.

En otra opción, la UTC puede cultivarse *in vitro* para producir productos biológicos con alto rendimiento. Una célula derivada de tejido del cordón umbilical que tanto produce naturalmente un producto biológico particular de interés (por ejemplo, un factor trófico) como que se ha manipulado genéticamente para producir un producto biológico tal, puede expandirse clónicamente usando las técnicas de cultivo descritas en el presente documento. Alternativamente, las células pueden expandirse en un medio que induce la diferenciación a una célula neural. En cada caso, los productos biológicos producidos por la célula y secretados en el medio pueden aislarse fácilmente del medio acondicionado usando técnicas de separación estándar, por ejemplo, tales como precipitación diferencial de proteínas, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía por filtración en gel, electroforesis y HPLC, por nombrar algunos. Puede usarse un "biorreactor" para aprovechar el procedimiento de flujo para la alimentación, por ejemplo, un cultivo tridimensional *in vitro*. Esencialmente, como medio fresco que se pasa a través del cultivo tridimensional, el producto biológico se lava del cultivo y puede entonces aislarse del flujo de salida, como antes.

Alternativamente, un producto biológico de interés puede permanecer dentro de la célula y, así su recogida puede requerir que las células se lisen, como se ha descrito anteriormente. El producto biológico puede entonces purificarse usando una cualquiera o más de las técnicas enumeradas anteriormente.

En otras opciones, la divulgación implica el uso de medio acondicionado de células derivadas de tejido del cordón umbilical cultivadas para su uso *in vitro* e *in vivo* como se describe más adelante. El uso de medio acondicionado de células derivadas de tejido del cordón umbilical permite que los beneficiosos factores tróficos secretados por las células derivadas de tejido del cordón umbilical se usen alogénicamente en un paciente sin introducir células intactas que podrían provocar el rechazo, u otras respuestas inmunológicas adversas. El medio acondicionado se prepara cultivando células en un medio de cultivo, luego sacando las células del medio.

El medio acondicionado preparado a partir de las poblaciones de células derivadas del cordón umbilical puede usarse como tal, adicionalmente concentrarse, por ejemplo, por ultrafiltración o liofilización, o incluso secarse, purificarse parcialmente, combinarse con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables como se conocen en la técnica, o combinarse con otros compuestos tales como productos biológicos, por ejemplo, composiciones de proteína farmacéuticamente útiles. El medio acondicionado puede usarse *in vitro* o *in vivo*, solo o combinado, por ejemplo, con células vivas autólogas o singénicas. El medio acondicionado, si se introduce *in vivo*, puede introducirse localmente en un sitio de tratamiento, o remotamente para proporcionar el crecimiento celular necesario o factores tróficos a un paciente.

En otra opción, una matriz extracelular (ECM) producida cultivando las células derivadas de tejido del cordón umbilical sobre sustratos líquidos, sólidos o semisólidos se prepara, se recoge y se utiliza como una alternativa a implantar células vivas en un sujeto en necesidad de reparación, sustitución o regeneración de células neurales. Las células derivadas de tejido del cordón umbilical se cultivan *in vitro*, sobre una región estructural tridimensional como se describe en cualquier parte en el presente documento, en condiciones tales que se secrete una cantidad deseada de ECM sobre la región estructural. Las células que comprenden el nuevo tejido se eliminan, y la ECM se procesa para uso posterior, por ejemplo, como una preparación inyectable. Para realizar esto, las células sobre la región estructural se destruyen y cualquier residuo celular se elimina de la región estructural. Este procedimiento puede llevarse a cabo de varias formas diferentes. Por ejemplo, el tejido vivo puede ultracongelarse en nitrógeno líquido sin

un crioprotector, o el tejido puede sumergirse en agua destilada estéril de manera que las células exploten en respuesta a la presión osmótica.

Una vez se han destruido las células, las membranas celulares pueden romperse y el residuo celular se elimina mediante tratamiento con un aclarado de detergente suave, tal como EDTA, CHAPS o un detergente de ión bipolar.

Alternativamente, el tejido puede digerirse enzimáticamente y/o extraerse con reactivos que descomponen las membranas celulares y permiten la eliminación de contenidos celulares. Ejemplos de tales enzimas incluyen, pero no se limitan a, hialuronidasa, dispasa, proteasas y nucleasas. Ejemplos de detergentes incluyen detergentes no iónicos tales como, por ejemplo, alquilaril políéter alcohol (TRITON X-100), octilfenoxi polietoxi-etanol (Rohm and Haas, Filadelfia, Pa.), BRIJ-35, un lauril éter de polietoxietanol (Atlas Chemical Co., San Diego, Ca.), polisorbato 20 (TWEEN 20), un monolaureato de sorbitano de polietoxietanol (Rohm and Haas, Filadelfia, Pa.), polietileno lauril éter (Rohm and Haas, Filadelfia, Pa.); y detergentes iónicos tales como dodecilsulfato de sodio, alcoholes alifáticos superiores sulfatados, alcanos sulfonados y alquilarenos sulfonados que contienen 7 a 22 átomos de carbono en una cadena ramificada o sin ramificar.

El conjunto de ECM puede llevarse a cabo en una variedad de formas, dependiendo al menos en parte de si el nuevo tejido se ha formado sobre una región estructural tridimensional que es biodegradable o no biodegradable, como en el caso de metales. Por ejemplo, si la región estructural es no biodegradable, la ECM puede eliminarse sometiendo la región estructural a sonicación, chorros de agua a alta presión, raspado mecánico o tratamiento suave con detergentes o enzimas, o cualquier combinación de los anteriores.

Si la región estructural es biodegradable, la ECM puede recogerse, por ejemplo, dejando que la región estructural se degrade o disuelva en disolución. Alternativamente, si la región estructural biodegradable está compuesta por un material que puede inyectarse él mismo junto con la ECM, la región estructural y la ECM pueden procesarse en conjunto para la posterior inyección. Alternativamente, la ECM puede eliminarse de la región estructural biodegradable por cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente para la recogida de ECM de una región estructural no biodegradable. Todos los procedimientos de recogida se diseñan preferentemente de manera que no desnaturalicen la ECM.

Después de recogerse, la ECM puede procesarse adicionalmente. Por ejemplo, la ECM puede homogeneizarse a partículas finas usando técnicas muy conocidas en la técnica, tales como por sonicación, de manera que pueda pasar a través de una aguja quirúrgica. Los componentes de la ECM también pueden reticularse, si se desea, por irradiación gamma. Preferentemente, la ECM puede irradiarse entre 0,25 y 2 mega-radianes para esterilizar y reticular la ECM. Es posible la reticulación química usando agentes que son tóxicos, tales como glutaraldehído, pero generalmente no se prefiere.

Las cantidades y/o relaciones de proteínas, tales como los diversos tipos de colágeno presentes en la ECM, pueden ajustarse mezclando la ECM producida por las células de la invención con ECM de uno o varios de otros tipos de células. Además, sustancias biológicamente activas, tales como proteínas, factores de crecimiento y/o fármacos, pueden incorporarse en la ECM. Sustancias biológicamente activas a modo de ejemplo incluyen factores tisulares de crecimiento, tales como TGF-beta, y similares, que promueven la curación y reparación de tejido en el sitio de la inyección. Tales agentes adicionales pueden utilizarse en cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente en el presente documento, por ejemplo, con lisados de células completas, fracciones celulares solubles, o componentes y productos purificados adicionalmente producidos por las células derivadas de tejido del cordón umbilical.

Cultivo celular

Las células aisladas pueden usarse para iniciar, o sembrar, cultivos celulares. Las células aisladas se transfieren a recipientes de cultivo de tejido estériles tanto no recubiertos como recubiertos con matriz extracelular o ligandos tales como laminina, colágeno (nativo, desnaturalizado o reticulado), gelatina, fibronectina, y otras proteínas de la matriz extracelular. Las células se cultivan en cualquier medio de cultivo que pueda sostener el crecimiento de las células tal como, pero no se limita a, DMEM (alta o baja glucosa), DMEM avanzado, DMEM/MCDB 201, medio basal de Eagle, medio F10 de Ham (F10), medio F-12 de Ham (F12), medio Dulbecco modificado con Iscove, medio de crecimiento de citoblastos mesenquimatosos (MSCGM), DMEM/F12, RPMI 1640 y medio sin suero suero/medio comercializado bajo el nombre comercial CELL-GRO-FREE (Mediatech, Inc., Herndon, Va.). El medio de cultivo puede complementarse con uno o más componentes que incluyen, por ejemplo, suero bovino fetal (SBF), preferentemente aproximadamente 2-15 % (v/v); suero equino (ES); suero humano (HS); beta-mercaptoetanol (BME o 2-ME), preferentemente aproximadamente 0,001 % (v/v); uno o más factores de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1), factor inhibidor de leucocitos (LIF) y eritropoyetina (EPO); aminoácidos, que incluyen L-valina; y uno o más agentes antibióticos y/o antimicrobianos para controlar la contaminación microbiana, tales como penicilina G, sulfato de estreptomicina, anfotericina B, gentamicina y nistatina, tanto solos como en combinación. El medio de cultivo comprende preferentemente medio de crecimiento (por ejemplo, DMEM-baja glucosa, suero, BME y un agente antibiótico).

Las células se siembran en recipientes de cultivo a una densidad para permitir el crecimiento celular. En una

realización preferida, las células se cultivan a aproximadamente 0 a aproximadamente 5 por ciento en volumen de CO₂ en aire. En algunas realizaciones preferidas, las células se cultivan a aproximadamente 2 a aproximadamente 25 por ciento de O₂ en aire, preferentemente aproximadamente 5 a aproximadamente 20 por ciento de O₂ en aire. Las células se cultivan preferentemente a una temperatura de aproximadamente 25 a aproximadamente 40 °C, y más preferentemente se cultivan a 37 °C. Las células se cultivan preferentemente en una estufa de incubación. El medio en el recipiente de cultivo puede ser estático o agitado, por ejemplo, usando un biorreactor. En algunas realizaciones, las células se cultivan bajo estrés oxidativo bajo (por ejemplo, con adición de glutatión, vitamina C, catalasa, vitamina E, N-acetilcisteína). "Estrés oxidativo bajo", como se usa en el presente documento, se refiere a condiciones de sin daño por radicales libres o mínimo daño por radicales libres a las células cultivadas.

Administración sistémica

La población de células se administra sistémicamente para tratar dolor y/o sitio de daño neural. El sitio de administración puede ser cualquiera determinado por el profesional médico que es el mejor, y así puede ser intravenosa, intramusculatura, intraperitoneal y similares. Las células pueden administrarse mediante cualquier medio que incluye, pero no se limita a, inyección e infusión.

Realizaciones específicas de la invención se refieren a la administración sistémica de una población de células para la reparación directa, regeneración, sustitución de, o el soporte de la reparación, regeneración o sustitución de células neurales para el tratamiento de daño, lesión y/o dolor neural.

Vías de administración sistémica de las células de la invención o composiciones de las mismas incluyen, pero no se limitan a, intravenosa, interperitoneal, intrarterial, o mediante jeringas con agujas o catéteres con o sin dispositivos de bomba. La migración de la población de células puede guiarse por el movimiento de fluidos dentro del cuerpo individual, tal como movimiento de la sangre o linfático, además de señales químicas, factores de crecimiento y similares.

En una realización específica, un catéter de administración puede usarse para administrar la población de células en un dispositivo de administración que facilita la introducción, por ejemplo, por inyección, de las células en los sujetos. Tales dispositivos de administración incluyen tubos, por ejemplo, catéteres, para inyectar células y fluidos en el cuerpo de un sujeto receptor. Además, la población de células puede administrarse en cualquier vehículo fisiológicamente compatible, tal como una solución salina tamponada. Vehículos y diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen solución salina, disoluciones de tampón acuosas, disolventes y/o medios de dispersión. Preferentemente, la disolución es estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se preserva contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos mediante el uso de antimicrobianos y antifúngicos que incluyen, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. Las disoluciones de la invención pueden prepararse usando un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable y, según se requiera, otros componentes enumerados anteriormente, seguido de esterilización por filtración, y luego incorporando la población de células como se describe en el presente documento.

Para células administradas tanto localmente como sistémicamente, las formas de dosificación y pautas para administrar la población de células o cualquiera de las otras composiciones terapéuticas o farmacéuticas descritas en el presente documento se desarrollan según buenas prácticas médicas, teniendo en cuenta la condición del paciente individual, por ejemplo, naturaleza y grado de la lesión o daño neural, edad, sexo, peso corporal y afección médica general, y otros factores conocidos para los médicos. Así, la cantidad eficaz de una composición farmacéutica que va a administrarse a un paciente se determina por estas consideraciones como se conoce en la técnica.

Si la población de células usada por el médico es células derivadas de tejido del cordón umbilical, entonces el trasplante con células alógenas, o incluso xenógenas, puede tolerarse en algunos casos ya que se ha mostrado que estas células no estimulan CMSP alógenas en una reacción linfocitaria mixta. Por consiguiente, se ha reconocido que las propias células proporcionan un efecto inmunosupresor, previniendo así el rechazo del huésped de la población de células trasplantada. En tales casos, puede no ser necesaria la inmunosupresión farmacológica durante la terapia celular.

Sin embargo, en otros casos puede ser deseable o apropiado inmunosuprimir farmacológicamente un paciente antes de iniciar la terapia celular. Esto puede llevarse a cabo mediante el uso de agentes inmunosupresores sistémicos o locales, o puede llevarse a cabo administrando las células en un dispositivo encapsulado, como se ha descrito anteriormente. Estos y otros medios para reducir o eliminar una respuesta inmunitaria a las células trasplantadas se conocen en la técnica. Como alternativa, la población de células puede modificarse genéticamente para reducir su inmunogenicidad, como se ha mencionado anteriormente.

Además, la supervivencia de una población trasplantada de células en un paciente vivo puede determinarse mediante el uso de una variedad de técnicas de barrido, por ejemplo, tomografía axial computerizada (TAC o TC), obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM) o tomografía de emisión de positrones (TEP). La determinación de la supervivencia del trasplante también puede hacerse en la autopsia extrayendo el tejido neural y

los tejidos de alrededor, y examinándolos visualmente o mediante un microscopio. Alternativamente, las células pueden tratarse con tinciones que son específicas para tejido neural, o sus tejidos de alrededor. También pueden identificarse células trasplantadas por la incorporación previa de colorantes trazadores tales como microesferas marcadas con rodamina o fluoresceína, azul rápido, micropartículas férricas, bisbenzamida o productos génicos

5 indicadores genéticamente introducidos, tales como beta-galactosidasa o beta-glucuronidasa.

Agentes o compuestos administrados con la población de células

10 Las células de la presente invención pueden incubarse y/o tratarse en cualquier etapa en su preparación para el trasplante, por ejemplo, durante la disección, digestión limitada, disociación, siembra en placa y/o producción de suspensiones de células para trasplante, con varios agentes o factores que promueven la supervivencia, crecimiento, diferenciación y/o integración de las células *in vitro* y/o en el sujeto receptor, o que adicionalmente ayudan en el tratamiento de dolor crónico. La administración de agentes adicionales puede empezar antes del trasplante de las células, puede empezar en el momento del trasplante, o puede empezar después del trasplante. La

15 administración de agentes adicionales puede limitarse en duración (por ejemplo, puede consistir en una única administración del agente) o puede ser de duración prolongada (por ejemplo, puede administrarse al sujeto repetidamente durante un largo periodo de tiempo).

20 En algunas realizaciones, uno o más compuestos o componentes se administran en paralelo, secuencialmente, o se formulan directamente con la población de células. Ejemplos de otros componentes que pueden añadirse a las células administradas incluyen, pero no se limitan a: (1) otros factores neurotróficos tales como factor neurotrófico derivado de cerebro, factor neurotrófico ciliar, neurotrofina-3, neurotrofina 4/5, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento de fibroblastos ácido, factor de crecimiento de fibroblastos básico, factor de crecimiento derivado de plaquetas, hormona liberadora de tirotropina, factor de crecimiento epidérmico, anfirregulina, factor de crecimiento transformante, factor de crecimiento transformante, factor de crecimiento similar a la insulina; (2) componentes de la matriz extracelular seleccionados, tales como uno o más tipos de colágeno conocidos en la técnica, y/o factores de crecimiento, plasma enriquecido en plaquetas y fármacos (alternativamente, células derivadas de tejido del cordón umbilical pueden manipularse genéticamente para expresar y producir factores de crecimiento); (3) agentes antiapoptóticos (por ejemplo, eritropoyetina (EPO), mimeticuerpo de EPO, trombopoyetina, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF)-I, IGF-II, factor de crecimiento de hepatocitos, inhibidores de caspasa); (4) compuestos antiinflamatorios (por ejemplo, inhibidores de MAP cinasas p38, inhibidores de TGF-beta, estatinas, inhibidores de IL-6 y IL-1, Pemirolast, Tranilast, Remicade (Centocor, Inc., Malvern, Pa.), sirolimus y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) (tales como tepoxalina, tolmetina y suprafen); (5) agentes inmunosupresores o inmunomoduladores, tales como inhibidores de la calcineurina, inhibidores de mTOR, antiproliferativos, corticosteroides y diversos anticuerpos; (6) anestésicos locales; y (7) otros factores angiogénicos, fármacos angiogénicos o factores o fármacos mioregenerativos o mioprotectores.

30

35

40 En una realización, tales agentes o factores pueden añadirse en el sitio de trasplante en el sujeto receptor después de que las células de la invención se hayan trasplantado en él. En algunos casos, por ejemplo, estos agentes pueden minimizar o contrarrestar efectos perjudiciales sobre las células resultantes de los procedimientos usados para preparar las células para el trasplante. Por ejemplo, células preparadas para el trasplante pueden experimentar traumatismo celular y/o hipoxia que conduce a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como el anión radical superóxido, peróxido de hidrógeno y el radical libre hidroxilo. Las ROS son conocidas por afectar adversamente la función celular, lo más probablemente por afectar una variedad de componentes de la membrana e intracelulares que incluyen canales de iones, lípidos de la membrana, mecanismos de transporte tales como la Na/K ATPasa y transporte de intercambio de Na/glutamato y enzimas citosólicas tales como glutamina sintasa. Además, las especies reactivas de oxígeno provocan la peroxidación de lípidos de la membrana y, por consiguiente pueden reducir la supervivencia de las células en los trasplantes.

45

50 Para minimizar y/o contrarrestar los efectos adversos de estos tipos de estrés oxidativo durante la preparación de las células para trasplante, las células de la presente invención pueden incubarse y/o tratarse con antioxidantes en cualquier etapa durante la preparación. Ejemplos de tales antioxidantes incluyen los antioxidantes de enzima superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa y agentes que promueven la formación de glutatión, por ejemplo, N-acetilcisteína (NAC). Otros antioxidantes incluye lazaroides, por ejemplo, U-74389G y U-83836E, que son aminoesteroides que se diseñan para localizarse en la membrana celular e inhibir la peroxidación de lípidos, mientras que secuestran radicales libres. Otros ejemplos de antioxidantes que pueden añadirse a los cultivos celulares y suspensiones de células incluyen TGF, vitamina E, vitamina C, beta-caroteno, y otros compuestos que secuestran ROS, inhiben la producción de ROS y/o inhiben la peroxidación de lípidos.

55

60 Enzimas antioxidantes, tales como SOD, secuestran ROS y previenen la reacción de superóxido con óxido nítrico para formar el anión peroxinitrito, que se ha mostrado que es tóxico para células cultivadas. Estas enzimas pueden incubarse con las células de la invención como se ha descrito anteriormente. Otro procedimiento de introducción de estas enzimas en las preparaciones celulares de la presente invención es para modificar genéticamente las células para contener el ácido nucleico que codifica tales enzimas. Las células genéticamente modificadas pueden entonces producir agentes que potencian la supervivencia, crecimiento y diferenciación de las células injertadas en el sujeto receptor. Por ejemplo, las células de la invención pueden transfectarse con el gen humano para la superóxido

65

dismutasa de Cu/Zn, una enzima esencial en la desintoxicación de radicales libres de oxígeno, que hace que las células transfectadas expresen SOD y, por consiguiente, desintoxiquen eficazmente ROS generadas durante la preparación e implantación de tejido para así aumentar la supervivencia de las células trasplantadas.

Además, el entorno oxidante de las células *in vitro* puede modificarse para inhibir el estrés oxidativo celular. Por ejemplo, antes del trasplante, la presión parcial del oxígeno en el entorno de las células puede disminuirse de la presión parcial del oxígeno normal, es decir, aproximadamente 150 torr de O₂, a una presión parcial del oxígeno disminuida, es decir, 38 torr de O₂ (aproximadamente 5 % de O₂). Este procedimiento de disminución del estrés oxidativo puede combinarse con el tratamiento de las células con uno o más de los antioxidantes anteriormente descritos.

Los inhibidores de NOS, tales como gangliósidos, FK506 y ciclosporina A, pueden añadirse a las preparaciones de células para inhibir la producción de NO, disminuyendo así la producción de peroxinitrito y sus derivados. La superóxido dismutasa es otro agente que puede disminuir los efectos adversos de la sobreproducción de NO y los efectos tóxicos que media.

Para prevenir el traumatismo y sus efectos adversos asociados, por ejemplo, peroxidación de membranas, daño celular inducido por radicales libres inducido por la preparación de las células de la invención para implantación, las células de la invención pueden transfectarse con ácidos nucleicos que codifican productos génicos antiapoptóticos, tales como el producto génico bcl-2 y/o crmA. Además, las células transfectadas de la invención pueden tratarse con agentes que regulan por incremento la expresión o función de estos productos génicos, por ejemplo, TGF1 y TGF3 que regulan por incremento la expresión de bcl-2, factor de crecimiento nervioso (NGF) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Además, las células de la invención también pueden transfectarse con ácido nucleico que codifica estos factores.

Para promover adicionalmente la supervivencia de las células de la invención en el sujeto receptor, las células pueden trasplantarse conjuntamente con un agente angiogénico o transfectarse con ácido nucleico que codifica un agente angiogénico. Tras el trasplante, el agente angiogénico promueve el crecimiento hacia adentro de vasos sanguíneos en la población de células. Como resultado de este crecimiento hacia adentro de vasos, las células trasplantadas obtienen nutrientes suficientes para proliferar y sobrevivir dentro del sujeto receptor. Muchos factores de crecimiento presentan actividad angiogénica. Por ejemplo, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), PDGF, factor de crecimiento de fibroblastos ácido y básico (FGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF) y K-FGF poseen actividad angiogénica y pueden usarse en los procedimientos de la invención para fomentar el crecimiento hacia adentro de vasos sanguíneos en las células trasplantadas de la invención.

Otros factores, tales como factores neurotróficos, que contribuyen al desarrollo neural, formación de fibras nerviosas y mantenimiento de neuronas pueden añadirse a las células de la invención *in vitro* durante la preparación para el trasplante y/o a la propia suspensión de células para la introducción en el sujeto individual junto con las células de la invención. Las células de la invención también pueden modificarse genéticamente para producir tales factores neurotróficos como se describe en el presente documento. El factor neurotrófico que se añade a las células de la presente invención puede seleccionarse basándose en la presencia de sus receptores sobre las células que van a trasplantarse. Por ejemplo, las células mesencefálicas poseen receptores para los siguientes factores neurotróficos: factor neurotrófico derivado de la línea celular de la glía (GDNF), que promueve la supervivencia de, diferenciación morfológica de y captación de dopamina de alta afinidad en células mesencefálicas; factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF); factor neurotrófico ciliar (CNTF), que previene la degeneración inducida por axotomía de células mesencefálicas; midkina, que promueve la supervivencia y diferenciación de células mesencefálicas; EGF, que aumenta la supervivencia y maduración de células mesencefálicas; factor de crecimiento similar a la insulina I y II e insulina; FGF ácido; FGF básico, que inducen un aumento significativo en el número de células portadoras de neuritas, además de en el grado de su red de fibras; neurotrofina-3 (NT-3) y neurotrofina 4/5 (NT-4/5); y factor 2 de crecimiento transformante (TGF2) y factor 3 de crecimiento transformante (TGF3).

Los factores neurotróficos que promueven la supervivencia de células neurales pueden seleccionarse basándose en la presencia de receptores sobre las células. Los receptores para FGF básico, BDNF, NT-3 y NT-4/5 pueden encontrarse sobre ciertas células neurales. Así, en una realización, las células de la invención pueden transfectarse con los ácidos nucleicos que codifican uno o más de estos factores. En otra realización, uno o más de estos factores pueden añadirse a la preparación de células neurales antes del trasplante. Estos factores neurotróficos potencian la supervivencia de las células de la invención en el sujeto receptor. Similarmente, los factores neurotróficos que presentan especificidad por células corticales y, por consiguiente, que pueden usarse para promover la supervivencia de tales células tras el injerto funcionando en un sujeto receptor, incluyen factor de crecimiento nervioso (NGF), que previene, por ejemplo, la atrofia de neuronas colinérgicas del prosencéfalo axotomizadas; BDNF, y NT-3 y NT-4/5.

En otra realización, los factores neurotróficos descritos en el presente documento pueden usarse juntos o en combinación con otros compuestos, tales como neurotransmisores, para aumentar sus efectos neurotróficos. Además, se contempla que diversas combinaciones de factores neurotróficos descritos en el presente documento pueden actuar sinérgicamente y, por tanto, pueden usarse juntas para promover la supervivencia de las células

trasplantadas de la invención.

Ciertos fármacos también poseen actividad neurotrófica. Ejemplos de tales fármacos incluyen FK506 y ciclosporina A que bloquean la neurotoxicidad provocada por glutamato que actúa en receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), por ejemplo, aumentando los niveles fosforilados de NOS. Como la NOS fosforilada inhibe su actividad catalítica, estos fármacos reducen eficazmente la formación de NO y previenen los efectos neurotóxicos de NMDA sobre estas células. Otros fármacos que poseen actividad neurotrófica y pueden usarse en la presente invención son aquellas moléculas pequeñas que se unen a las mismas proteínas de unión que FK506 y/o ciclosporina A y, por tanto, median en efectos neuroprotectores similares. En una realización, estos fármacos se administran al sujeto, además de la población de células, para tratar dolor crónico y/o espasticidad.

En una realización, las combinaciones de uno o más de los agentes y factores anteriormente descritos pueden usarse para promover la supervivencia de las células de la invención antes o después de que las células se trasplantan en sujetos receptores. Por ejemplo, las células de la presente invención pueden ponerse en contacto con uno o más de los agentes o factores descritos en el presente documento para promover la supervivencia de las células *in vitro* y/o *in vivo*. En otra realización, las células de la invención pueden transfectarse con el ácido nucleico de uno o más de los agentes o factores descritos en el presente documento y también ponerse en contacto con uno o más de los agentes o factores descritos en el presente documento. Además, aunque muchos de los factores neurotróficos descritos en el presente documento son específicos para un tipo de célula particular, la asociación de estos factores con un tipo de célula tal no excluye el uso de ese factor con un tipo de célula diferente. El tratamiento de las células de la invención con los agentes o factores descritos en el presente documento puede producirse simultáneamente o secuencialmente.

En otra realización, la administración de la población de células para tratar dolor crónico puede acoplarse con la administración de terapias tradicionales para estas afecciones (por ejemplo, con opioides o baclofeno). En ciertos sujetos, tales terapias de combinación pueden producir mejora óptima de los síntomas.

En otra realización, pueden administrarse agentes que inhiben la actividad de linfocitos T en el sujeto, además de las células objeto. Como se usa en el presente documento, un agente que inhibe la actividad de linfocitos T se define como un agente que produce la eliminación o destrucción de linfocitos T dentro de un sujeto o inhibe las funciones de linfocitos T dentro del sujeto, así los linfocitos T pueden todavía estar presentes en el sujeto, pero están en un estado no funcional, de forma que son incapaces de proliferar o provocar o realizar funciones efectoras, tales como producción de citocinas, citotoxicidad, etc. El término "linfocito T" engloba linfocitos T de sangre periférica maduros. El agente que inhibe la actividad de linfocitos T puede también inhibir la actividad o maduración de linfocitos T inmaduros.

Los siguientes ejemplos describen la invención en mayor detalle. Estos ejemplos pretenden ilustrar adicionalmente, no limitar, aspectos de la invención descrita en el presente documento.

EJEMPLO 1

Siembra de células en construcciones de fibrinógeno-trombina

Se sacaron UTC humanas de almacenamiento criogénico, se sacaron del crioprotector y se lavaron con PBS que contenía Ca/Mg. Las células se resuspendieron en un volumen de 200-300 µl. Se diluyeron fibrinógeno y trombina en alícuotas de 50 µm de forma que la adición de 50 µl de trombina y 50 µl de fibrinógeno a las células produjo una dilución final de 1:133 y 1:8, respectivamente. Inmediatamente tras la adición del componente de trombina, el material se dispensó en una placa de cultivo celular de baja agrupación y se colocó en la estufa de incubación con medio de cultivo como se ha descrito previamente. Las células y la construcción se dispusieron en una estufa de incubación de 37 °C con 5 % de CO₂ durante 4 días. Para evaluar la viabilidad, las células se incubaron con tinción Live/Dead (Invitrogen, Carlsbad CA) usando instrucciones del fabricante y se visualizaron bajo un microscopio fluorescente.

Se sembraron UTC humanas en placa con trombina y fibrinógeno. Después de cuatro días, las hUTC se comprobaron para la viabilidad por microscopía fluorescente tras la aplicación de una tinción viable. Las construcciones fueron factibles para la administración de hUTC debido a que las hUTC seguían siendo viables en construcciones de fibrinógeno-trombina *in vitro* a los cuatro días

Una fotografía que muestra viabilidad celular se ilustra en la Figura 1.

EJEMPLO 2

Administración local y sistémica de células

Para demostrar que la administración local y sistémica de hUTC a animales redujo el comportamiento de dolor, los inventores sometieron los animales a lesión por constricción crónica (CCI). La CCI es un modelo común para probar

agentes y terapias para dolor neuropático (véase Bennett y Xie, Pain, 1988; 33:87 - 107). Ratas Sprague-Dawley que pesaban 200-225 g se anestesiaron primero con xilazina y ketamina. Se aisló el nervio ciático de los animales. Se pusieron cuatro ligaduras laxas usando hilo crómico para sutura de 4-0 sobre el nervio ciático a medida que sale de la escotadura ciática. El comportamiento inicial (sensibilidad mecánica a filamentos de Semmes-Weinstein) se obtuvo para todos los animales antes de la cirugía. Cinco o seis días tras la cirugía, los animales se volvieron a probar y los grupos se estratificaron para asegurar que cada grupo demostraba comportamiento de dolor similar y que la distribución de la gravedad del dolor en cada grupo era similar.

5-6 días tras la cirugía, inmediatamente tras la prueba, los animales se trataron con uno de los siguientes:

1. Se trataron ocho animales con una construcción de trombina-fibrinógeno modificada. La construcción (un hemostático modificado) se aplicó al nervio lesionado: mientras estaban bajo anestesia se inyectaron 300 μ l - 400 μ l de material de gel a la proximidad del nervio lesionado. El gel se preparó del siguiente modo: Se mezclaron 300 μ l de PBS que contenía calcio y magnesio con trombina 50 μ l (1:133, final) y 50 μ l de fibrinógeno (1:8, final).
2. Se trataron ocho animales con una formulación de células local. La formulación comprendió una dosis de 3×10^5 células en 300 μ l de PBS que contenía calcio y magnesio, 50 μ l de trombina (1:133, final) y 50 μ l de fibrinógeno (1:8, final). Mientras estaban bajo anestesia se inyectaron 300 μ l - 400 μ l de material de gel a la proximidad del nervio lesionado.
3. Se trataron ocho animales con una dosis IV de 3×10^6 células en 2 ml de PBS que contenía calcio y magnesio.
4. Se trataron ocho animales con una dosis IV de 2 ml de PBS que contenía calcio y magnesio.
5. Dieciséis animales de control que se sometieron a CCI permanecieron sin tratamiento.

Administración local

Los resultados de la administración local se ilustran en la Figura 2.

Las puntuaciones iniciales del pretratamiento no fueron significativamente diferentes de los valores normales predichos (puntuaciones de diferencia de 'cero'). Además, no hubo diferencias significativas entre grupos para las puntuaciones iniciales.

Cinco días tras la cirugía, los tres grupos desarrollaron alodinia mecánica significativa (grupo de CCI: $-0,36 \pm 0,08 \log_{10} \text{ gm}$, grupo de vehículo: $-0,31 \pm 0,07 \log_{10} \text{ gm}$, grupo de construcción: $-0,34 \pm 0,08 \log_{10} \text{ gm}$) en comparación con los niveles iniciales (grupo de CCI: $-0,02 \pm 0,01 \log_{10} \text{ gm}$, grupo de vehículo: $-0,05 \pm 0,02 \log_{10} \text{ gm}$, grupo de construcción: $-0,06 \pm 0,04 \log_{10} \text{ gm}$). Once y 20 días tras la administración, el grupo de CCI (sin tratamiento) siguió significativamente hipersensible en comparación con los niveles iniciales ($-0,54 \pm 0,12 \log_{10} \text{ gm}$ y $-0,78 \pm 0,14 \log_{10} \text{ gm}$, respectivamente). El grupo de vehículo siguió significativamente hipersensible en comparación con el nivel inicial en los días 11 y 20 tras la administración, pero significativamente menos sensible que el grupo de CCI ($-0,18 \pm 0,01 \log_{10} \text{ gm}$ y $-0,27 \pm 0,12 \log_{10} \text{ gm}$, respectivamente). El grupo de construcción desarrolló hiposensibilidad significativa en el día 11 tras la administración ($0,21 \pm 0,19 \log_{10} \text{ gm}$) e hipersensibilidad significativamente reducida en el día 20 ($-0,08 \pm 0,03 \log_{10} \text{ gm}$).

Administración sistémica (i.v.)

Los resultados de la administración sistémica (i.v.) se ilustran en la Figura 3.

Las puntuaciones iniciales del pretratamiento no fueron significativamente diferentes de los valores normales predichos (puntuaciones de diferencia de 'cero'). Además, no hubo diferencias significativas entre grupos para las puntuaciones iniciales.

Cinco días tras la cirugía, los tres grupos desarrollaron alodinia mecánica significativa (grupo de CCI: $-0,35 \pm 0,08 \log_{10} \text{ gm}$, grupo de vehículo: $-0,40 \pm 0,05 \log_{10} \text{ gm}$, grupo de construcción: $-0,55 \pm 0,09 \log_{10} \text{ gm}$) en comparación con los niveles iniciales (grupo de CCI: $-0,02 \pm 0,01 \log_{10} \text{ gm}$, grupo de vehículo: $-0,01 \pm 0,01 \log_{10} \text{ gm}$, grupo de construcción: $-0,00 \pm 0,01 \log_{10} \text{ gm}$). Diez y 20 días tras la administración, los grupos de CCI (sin tratamiento) y de vehículo siguieron significativamente hipersensibles en comparación con los niveles iniciales (CCI: $-0,53 \pm 0,11 \log_{10} \text{ gm}$ y $-0,76 \pm 0,10 \log_{10} \text{ gm}$, respectivamente, vehículo: $-0,61 \pm 0,14 \log_{10} \text{ gm}$ y $-0,83 \pm 0,11 \log_{10} \text{ gm}$, respectivamente). La hipersensibilidad del grupo de construcción se redujo significativamente en el día 10 y día 20 en comparación con los otros dos grupos ($-0,33 \pm 0,10 \log_{10} \text{ gm}$ y $-0,41 \pm 0,11 \log_{10} \text{ gm}$).

EJEMPLO 3

Eficacia de la construcción biológica en aliviar dolor neuropático

El comportamiento de dolor se examinó tras la inyección local y tras la administración a la vena de la cola.

Material y procedimientos

Todas las ratas se sometieron a CCI como se ha descrito previamente. Brevemente, bajo anestesia con xilazina/ketamina, se aisló el nervio ciático de los animales. Se pusieron cuatro ligaduras laxas usando hilo crómico para sutura de 4-0 sobre el nervio ciático a medida que sale de la escotadura ciática. El comportamiento inicial (sensibilidad mecánica a filamentos de Semmes Weinstein) se obtuvo para todos los animales antes de la cirugía. Seis días tras la cirugía, los animales se volvieron a probar y los grupos se estratificaron para asegurar que cada grupo demostraba comportamiento de dolor similar y que la distribución de la gravedad del dolor en cada grupo era similar.

6 días tras la cirugía (como el dolor neuropático se verificó por la presencia de alodinia táctil), los animales se trataron con uno de los siguientes tratamientos:

1. Administración sistémica de aproximadamente 2 ml de fluido que contiene células o vehículo a la vena de la cola (Tabla 3-1).
2. Administración local de células o vehículo (Tabla 3-2)
3. Animales de control que se trataron con gabapentina antes de la prueba.

Entonces, los animales se probaron para sensibilidad mecánica (alodinia táctil) en el día 7, 10, 14, 17 y 21 tras el tratamiento. Los examinadores se cegaron al tratamiento; el código se abrió solo al final del estudio y tras el envío de los resultados al doctor a cargo del estudio.

El estudio se realizó en tres sesiones separadas.

Tabla 3-1: Administración sistémica

Grupo	Tratamiento	Regimen	Evaluación del dolor
A	Células 1e6 hUTC	Un estudio al día 6	Previo al dolor. 5-6 días post dolor. 7, 10, 14, 17, 21 días post tratamiento.
B	Células 1e7 hUTC		
C	pbs		
D	Células 3e6 hUTC		
GP	Gabapentina	Ensayos previos	

Tabla 3-2: Administración local

Grupo	Tratamiento	Regimen	Evaluación del dolor
1	Células 1.00E+06	Un estudio al día 6	Previo al dolor. 5-6 dias post dolor. 7, 10, 14, 17, 21 dias post tratamiento.
2	Colágeno (colbar) 1.00E+06 3.00E+05 1.00+05 0.00+00		
3			
4			
5			
6	Evicel (Omrix) 1.00E+06 3.00E+05 1.00+05 0.00+00		
7			
8			
9			
GP	Gabapentina	Ensayos previos	

Tras la eutanasia, los nervios relevantes se recogieron y se guardaron en formalina. La administración de la construcción y la prueba de comportamiento se realizaron por una persona que se cegó al grupo de tratamiento.

Análisis estadístico: Cada animal se evaluó contra su propio nivel inicial (para evaluar el comportamiento de dolor inicial) y contra su propio comportamiento de dolor y se contrastó con su propia sensibilidad mecánica pre-quirúrgica para evaluar la recuperación. Los datos se presentan como porcentaje de cambio de los niveles en la etapa de dolor

neuropático (5-6 días tras la cirugía). Para las medidas repetidas de tratamiento se realizó ANOVA, seguido de la prueba de PLSD de Fisher. Se proporcionan datos separados para patas afectadas y contralaterales.

Resultados:

Administración local

Las puntuaciones iniciales del pretratamiento no fueron significativamente diferentes de los valores normales predichos (puntuaciones de diferencia de 'cero' entre dos patas). Además, no hubo diferencias significativas entre grupos para las puntuaciones iniciales. Cinco días tras la cirugía, los tres grupos desarrollaron alodinia mecánica significativa en comparación con los niveles iniciales (véase para los datos de la fila).

Lado afectado:

Como se muestra en la Figura 4 para colágeno (Colbar) se esperaba que la gabapentina redujera el dolor. El vehículo y las células solas no tuvieron efecto sobre el comportamiento de dolor. La dosis baja (grupo 4) tuvo un corto efecto, hasta 10 días tras la administración. La dosis alta (grupo 2) tuvo el efecto más significativo que para el análisis global (prueba de PLSD de Fisher) no fue significativamente diferente del tratamiento satisfactorio con gabapentina. Sin embargo, es importante observar que este tratamiento no fue significativamente diferente del efecto de los otros grupos (el análisis estadístico se proporciona en la Figura 10).

Las patas contralaterales no demostraron alodinia táctil significativa, ninguno de los grupos de tratamiento tuvieron un efecto significativo sobre estas pruebas complementarias (los resultados en la Figura 5 y el análisis estadístico se proporcionan en la Figura 11).

Evicel (Omrix)

Como se muestra en la Figura 6 para Evicel (Omrix), el tratamiento con gabapentina redujo el dolor. La baja dosis (grupo 8) fue tan eficaz como la gabapentina, e incluso ligeramente superior en el día 14. El vehículo (grupo 9) fue más eficaz que las dos dosis superiores (grupos 6 y 7), que no tuvieron en absoluto ningún efecto paliativo (los resultados mostrados en la Figura 6 y el análisis estadístico se proporcionan en la Figura 12).

Las patas contralaterales no demostraron alodinia táctil, ninguno de los grupos de tratamiento tuvo un efecto significativo en estas pruebas complementarias (el análisis estadístico se proporciona en la Figura 7).

Administración sistémica

Lado afectado: Administración sistémica del lado afectado (izquierdo), cambio de dolor neuropático

Como se muestra en la Figura 8, la gabapentina redujo el dolor. El efecto de 1e7 (grupo B) fue próximo al efecto de la gabapentina. El efecto de los otros dos grupos (A y D) no fue diferente al efecto de pbs (el análisis estadístico se proporciona en la Figura 14)

Lado contralateral: Administración sistémica del lado contralateral (derecho), cambio de dolor neuropático

Las patas contralaterales no demostraron alodinia táctil, ninguno de los grupos de tratamiento tuvo un efecto significativo sobre la sensibilidad mecánica (resultados mostrados en la Figura 9 y análisis estadístico proporcionado en la Figura 15).

Conclusiones

El dolor se redujo significativamente por la administración sistémica de 1e7 células hUTC y por la administración local de alta dosis (1,00E+065) de células en vehículo Colbar. Sin embargo, el efecto más significativo se indujo por la administración local de baja dosis (1,00E+05) de células con vehículo Evicel. Este efecto no fue inferior al efecto inducido por las mediciones de dolor neuropático comunes de gabapentina.

EJEMPLO 4

La evaluación del efecto del tratamiento y analgésico de células inyectadas sistémicamente en el modelo de Chung de dolor en ratas

Este estudio fue para examinar el efecto antinociceptivo de células uHTC en el modelo de Chung de dolor neuropático. Los tratamientos de células se administraron por la administración sistémica en el día de estudio 6 tras la cirugía, y se midió su efecto sobre la respuesta al dolor. Este estudio no siguió ninguna pauta reglamentaria específica. Los resultados demuestran que hubo un efecto de alivio significativo del dolor en todas las dosis administradas de células hUTC. La gabapentina, que se administró a una dosis de 150 mg/kg y sirvió de control

positivo, fue significativamente activa en reducir el dolor como compuesto analgésico en todos los días de prueba en comparación con el vehículo.

Al principio del estudio, el peso corporal medio total de todos los animales en el estudio fue $192,62 \pm 1,42$ g. Todos los animales ganaron peso a lo largo del estudio y no se encontraron diferencias significativas en el aumento de peso.

Se usó Von Frey para evaluar la respuesta de los animales al dolor. Los resultados se calcularon usando los tres siguientes procedimientos diferentes.

Resultados de Von Frey calculados por división de log. La respuesta al dolor se evaluó usando el aparato de Von Frey (Touch Test®). Los gramos de fuerza necesaria para retirar la pata se convirtieron en log de la fuerza según los valores facilitados por Touch Test®. El log de la fuerza necesaria para retirar la pata sana (derecha) se dividió entre el log de la fuerza necesaria para retirar la pata operada (izquierda). La comparación de cada grupo de tratamiento con el grupo de vehículo de control en cada momento de tiempo de medición mostró un alivio significativo del dolor en todos los grupos tratados frente al grupo de vehículo en varios momentos de tiempo ($p < 0,01$ y $p < 0,05$). El tratamiento con el producto de control positivo, gabapentina (grupo 5M), fue activo como compuesto de alivio del dolor durante todos los días de prueba en comparación con el grupo de vehículo tratado (grupo 4M; $p < 0,01$).

Resultados de Von Frey calculados por simples restas. Otra forma de calcular los valores de Von Frey fue por la simple resta de la fuerza necesaria para retirar la pata sana derecha menos la fuerza necesaria para retirar la pata dolorida izquierda. Cuando se comparan los valores de Von Frey de cada grupo de tratamiento con el grupo de vehículo de control en cada momento de tiempo de medición, los resultados mostraron un alivio significativo del dolor en todos los grupos tratados frente al grupo de vehículo en varios momentos de tiempo. El control positivo, gabapentina (grupo 5M), tuvo puntos de alivio significativo del dolor durante todos los días de prueba en comparación con el grupo de vehículo tratado (grupo 4M; $p < 0,01$).

Resultados de Von Frey calculados por simples restas frente a pretratamiento. La comparación de los valores de Von Frey de cada grupo de tratamiento en cada momento de tiempo de medición con los valores de Von Frey de pretratamiento medidos en el día de estudio 5 mostraron un alivio significativo del dolor en todos los grupos tratados frente al grupo de vehículo en varios momentos de tiempo. El control positivo, gabapentina (grupo 5M), tuvo un efecto de alivio significativo del dolor sobre todos los días probados en comparación con el mismo grupo en el día de estudio 5 antes del tratamiento ($p < 0,01$).

El objetivo del presente estudio era evaluar la actividad terapéutica de células hUTC facilitadas por la administración sistémica mediante una vena de la cola en el día 6 después de cirugía en el modelo de dolor neuropático de Chung en ratas.

Productos de prueba experimentales:

Materiales	Nombre	Cat. No.	Lot. No.	MDB Int #	Proveedor	Condiciones de almacenaje	Fecha de caducidad
Productos de prueba	Células hUTC	N/A	Q112108	N/A	Sponsor	-80°C	N/A
	Etanol	N/A	0307AL20.4	N/A	Floris	Temperatura de la habitación	Mar. 2011
Vehículo	PBS	020201 A	743185	0906-0110	Biological Industries	2-8°C	Oct. 2009
Control Positivo	Gabapentina	1287303	GOE005	USP	Sponsor	Temperatura de la habitación	N/A
Productos de Anestesia	Ketanima	N/A	440785	0906-0122	Supply	Temperatura de la habitación	Oct. 2011
	Xilacina	N/A	B9367	0607-118	Veterinarian Supply	Temperatura de la habitación	Jul. 2009
	CO2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

Preparación de hUTC para inyección sistémica:

Todas las etapas se realizaron con viales abiertos de hUTC usando técnica aséptica en una cabina de seguridad BSL II certificada.

Descongelación de hUTC (las células se almacenaron a -80 °C):

El criovial de hUTC se descongeló rodando suavemente el vial en un baño de agua a 37 °C durante aproximadamente 1-2 minutos hasta que se descongeló. El vial se pulverizó con etanol, se secó con un Kimwipe y se puso en la cabina de bioseguridad. Se quitó la tapa del criovial y el contenido se mezcló suavemente por pipeteado arriba y abajo dos veces usando una pipeta de 1 ml. Entonces, 1 ml de la suspensión de hUTC descongelada se transfirió usando la pipeta a un tubo de 15 ml. Se usó una pipeta de 1 ml nueva para añadir 1 ml de PBS estéril al criovial. Con el fin de suspender las células hUTC descongeladas residuales, el PBS se pipeteó arriba y abajo dos veces. Un ml de la suspensión de hUTC residual se pipeteó en el tubo de 15 ml que contenía la suspensión de hUTC descongelada.

Usando una pipeta de 10 ml nueva, se añadieron 11 ml de PBS a la suspensión de hUTC para alcanzar un total de 13 ml. Para cada vial de células se usó 1 ml de lavado + 12 ml de lavado.

La suspensión de hUTC se centrifugó a 250 g (o 1200 rpm) durante 5 minutos a temperatura ambiente. El tubo se sacó de la centrífuga y, mientras que se tenía cuidado de no alterar las hUTC sedimentadas, se pipetearon arriba 12,7 ml de sobrenadante y se desecharon usando una pipeta de 10 ml.

Se añadió un ml de PBS estéril por vial de sedimento de hUTC descongeladas para igualar un volumen total de aproximadamente 1 ml/vial usando una pipeta de 5 ml estéril. El sedimento se resuspendió pipeteando arriba y abajo suavemente asegurándose de no crear burbujas.

Se añadieron cincuenta µl de disolución de azul de tripano al tubo de recuento de la microcentrífuga de hUTC. Usando un P200 Pipetman, las células se diluyeron 1:10 (50 µl en 500 µl) en PBS. Se añadieron cincuenta µl de la suspensión de hUTC diluida a la disolución de azul de tripano en el tubo de microcentrífuga usando un P200 Pipetman. El contenido del tubo se mezcló suavemente, pero minuciosamente, por pipeta y se cargaron 10 µl de hUTC teñidas con azul de tripano en un hemocitómetro. Las hUTC se contaron usando las cuatro cuadrículas grandes más externas del hemocitómetro. Se registró el número y la suma de tanto las hUTC incoloras (viables) como teñidas de azul (no viables). La concentración de hUTC viables, contenido de hUTC viables total de la suspensión de células y el % de hUTC viables se calcularon del siguiente modo:

1. hUTC incoloras totales. $\div 4 \times 20 \times 10.000 =$ Concentrado de hUTC viables en hUTC /ml.
2. Volumen final * concentrado de hUTC viables en hUTC /ml = hUTC viables totales.
3. hUTC incoloras totales $\div$ hUTC incoloras totales y teñidas de azul $\times 100 =$ % de hUTC viables.

Se calculó el volumen para resuspender las hUTC de manera que se lograra la concentración apropiada de hUTC / µl.

Para 2 ml/animal:

- Para 1 * 10⁶ : 5*10⁵ / ml
- Para 3*10⁶: 1,5*10⁶ / ml
- Para 10*10⁶ 5*10⁶ / ml

Las células se sacaron por jeringa de antemano, se guardaron horizontalmente sobre hielo y se mezclaron rodando suavemente inmediatamente antes de la inyección.

SISTEMA DE PRUEBA

5	Especie/cepa:	Rata Sprague Dawley.
	Fuente:	Harlan Laboratories Israel, Ltd. (Certificado ISO 9001:2000, n°: US2002/3081).
	Sexo:	Masculino
	N° total de animales:	n= 60
	Edad:	Adultas jóvenes; pesando 160-189 g al inicio del estudio.
10	Peso corporal:	La variación de peso de los animales en el momento del inicio del tratamiento no superó $\pm$ 20 % del peso medio.
	Salud del animal:	El estado de salud de los animales usados en este estudio se examinó tras su llegada. Solo los animales con buena salud se aclimataron a las condiciones de laboratorio y se usaron en el estudio.
15	Aclimatación:	5 días.
	Alojamiento:	Durante la aclimatación y a lo largo de la duración del estudio entero, los animales se alojaron dentro de una instalación para roedores de acceso limitado y se mantuvieron en grupos con un máximo de 5 ratas por jaula de polipropileno. Las jaulas se proveyeron de suelos sólidos y se llenaron con virutas de madera estéril como material de lecho.
20	Comida y agua:	Los animales se proporcionaron a voluntad con una dieta de roedor estéril comercial y tuvieron acceso libre a agua potable que se suministró a cada jaula mediante botellas de polietileno con bebederos de acero inoxidable. Un análisis del lote de pienso del lote de dieta usado en el estudio se incluyó en los archivos con los datos del estudio. El agua se monitorizó periódicamente.
25	Entorno:	Se fijaron condiciones medioambientales automáticamente controladas para mantener la temperatura a 20-24 °C con una humedad relativa (HR) del 30-70 %, un ciclo de luz:oscuridad de 12:12 horas y 15-30 cambios de aire/h en la sala de estudio. La temperatura y la HR se monitorizaron diariamente. El ordenador de control monitorizó el ciclo de luz.
30	Identificación:	Los animales se proveyeron de una única marca de identificación animal en la oreja. Este número también apareció sobre una tarjeta de la jaula, visible en la parte delantera de cada jaula. La tarjeta de la jaula también contuvo el número de estudio, todos los otros detalles relevantes en cuanto al grupo de tratamiento.
	Aleatorización:	Los animales se asignaron aleatoriamente a grupos experimentales.
	Término:	Al final del estudio, los animales supervivientes se sacrificaron por asfixia con CO ₂ .
35	Justificación:	Se seleccionó la rata ya que representó la especie de elección para este modelo animal experimental.

CONSTITUCIÓN DE GRUPOS DE PRUEBA Y NIVELES DE DOSIS:

40 La siguiente tabla enumera los 5 grupos experimentales que comprenden el estudio.

Tabla 4-1

45	Grupo #	Tamaño grupo	Objeto de prueba	Ruta	Dosis mg/kg)	Volumen (ml/animal)	Regimen
	1M	N=12	Células (Baja concentración)	sistémico	1*10 ⁶	2ml	Una vez, en estudio día 6
50	2M	N=12	Células (Media concentración)	sistémico	3*10 ⁶	2ml	Una vez, en estudio día 6
	3M	N=12	Células (Alta concentración)	sistémico	10*10 ⁶	2ml	Una vez, en estudio día 6
	4M	N=12	Vehículo de control (PBS)	sistémico	0	2ml	Una vez, en estudio día 6
55	5M	N=12	Control positivo (Gabapentina)	IP	150	5	120 minutos antes de cada comportamiento evaluación de partida el día de estudio 7
60							

65

PROCEDIMIENTOS DE PRUEBA:**Programa del estudio:**

Día de estudio	Tarea
-1	Medidas de peso corporal (línea base); Ensayos de dolor (línea base)
0	Operación chung
5	Medidas de peso corporal; Ensayos de dolor; Grupal
6	Tratamiento sistémico con células
7,10,14,17,21,26	Medidas de peso corporal; Ensayos de dolor
30	Medidas de peso corporal; Ensayos de dolor; Terminación estudio

Inducción de dolor neuropático: Bajo anestesia, la rata se colocó decúbito prono y los músculos paraespinales izquierdos se separaron del proceso espinoso a los niveles L4-S2. El proceso transversal de L6 se eliminó cuidadosamente con unas pequeñas pinzas gubias para identificar visualmente los nervios espinales L4-L6. Los nervios espinales L5 y L6 izquierdos se aislaron y se ligaron fuertemente con hebra de seda 3-0, y luego se cortaron con una cuchilla. Tras la cirugía, las ratas se devolvieron a las jaulas y permanecieron bajo una lámpara de calentamiento hasta que se despertaron.

Con el fin de formar grupos de tratamiento homogéneos y para adherirse a la aleatorización, todas las ratas operadas se agruparon según criterios de inclusión/exclusión. Solo se seleccionaron 60 animales operados en el día de estudio 5 después del procedimiento de Chung según criterios de inclusión/exclusión.

Criterios de inclusión:

- Se chupan la pata operada, acompañado de mordiscos suaves o tirar de las uñas con la boca;
- Mantener la pata en el aire;
- Llevar peso sobre el lado contralateral de la lesión nerviosa;
- Deformidades de la pata trasera y postura y caminar anormales;
- Debilidad de la pata trasera izquierda.

Criterios de exclusión:

Los animales que no pudieron mover sus patas demostraron signos de que L4 estaba roto. Estos animales se excluyeron del estudio.

Tratamiento:

En el día de estudio 6 después de la cirugía de Chung, a los animales (grupos 1M, 2M, 3M y 4M) se les administraron sus tratamientos respectivos mediante inyección sistémica a la vena de la cola. Los animales en el grupo 5M recibieron tratamiento con gabapentina, a una dosis de 150 mg/kg i.p., 120 minutos antes de cada evaluación del comportamiento a partir del día de estudio 7. En todos los casos, toda la dosificación se aplicó como una única administración. Al final del estudio, los animales se sacrificaron con exposición a CO₂.

OBSERVACIONES Y EXÁMENES:**Exámenes de Von Frey:**

La respuesta al dolor se evaluó usando un aparato de Von Frey (Touch Test®) para alodinia mecánica. La rata se colocó en un recinto posicionado con una superficie de malla metálica, pero se dejó mover libremente. Las cabinas de las ratas se cubrieron con celofán rojo para disminuir las distribuciones medioambientales. Las pruebas empezaron después del cese del comportamiento explorador. El conjunto de monofilamentos proporcionó una escala aproximadamente logarítmica de fuerza real y una escala lineal de intensidad percibida. La escala logarítmica usada para los cálculos es la siguiente:

	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65						
)	1.65	2.36	2.44	2.83	3.22	3.61	3.84	4.08	4.17	4.31	4.56	4.74	4.93	5.07	5.18	5.46	5.88	6.10	6.45
)	0.008	0.02	0.04	0.07	0.16	0.40	0.60	1.00	1.40	2.00	4.00	6.00	8.00	10	15	26	60	100	180

El principio de operación: Cuando la punta de una fibra de longitud y diámetro dados se presiona contra la piel a ángulos rectos, la fuerza de aplicación aumenta a medida que el investigador continúa avanzando la sonda hasta que la fibra se dobla. Después de doblarse la fibra, la sonda puede continuar avanzando, que hace que la fibra se doble más, pero sin aplicar fuerza adicional. Este principio hace posible que el investigador use una sonda manual para aplicar una fuerza reproducible dentro de una amplia tolerancia a la pata.

Los roedores presentan un reflejo de retirada de la pata cuando la pata se toca inesperadamente. Puede usarse el evaluador sensorial Touch Test™ sobre las superficies plantares de la pata de la rata y el animal indicará sensación retrocediendo su pata. La fuerza mínima necesaria para elevar el reflejo de retirada se considera el valor de referencia.

Procedimiento de cálculo: Los datos sin procesar de la fuerza de Von Frey en gramos se convirtieron en el log de la fuerza según la tabla anterior. Además, se aplicó el máximo (60 g) para disminuir el alto hueco arbitrario entre las dos patas. El log de la fuerza necesaria para retirar la pata sana (derecha) se dividió entre el log de la fuerza necesaria para retirar la pata operada (izquierda).

El cálculo presenta los valores de las patas en el estado sano próximo a 1 cuando la relación entre la fuerza de cada pata es similar. El aumento en los valores presenta un estado más doloroso. Los resultados de los valores iniciales indicaron un valor de 1.

Pesos corporales: La determinación de los pesos corporales individuales de los animales se hizo cada día de prueba.

Análisis estadístico: Todos los parámetros se representan como media y error estándar de la media (EEM) y se analizaron usando una prueba de la t, para datos emparejados y para datos independientes, bilateral (Microsoft Excel). Los valores de probabilidad (p) inferiores a 0,05 o inferiores a 0,01 se consideraron significativos.

Criterios de valoración humanos: Al final del estudio, los animales se sacrificaron con exposición a CO₂.

Resultados: Al principio del estudio, el peso corporal medio total para todos los animales fue $192,62 \pm 1,42$ g. Aunque todos los animales ganaron peso durante el periodo del estudio, no se observaron diferencias significativas entre los grupos (Figuras 17 y 18.)

Examen de Von Frey: La respuesta al dolor se evaluó usando el aparato de Von Frey (Touch Test®) para alodinia mecánica. La fuerza de retirada en gramos se convirtió en el log de la fuerza según los valores facilitados por Touch Test® (Sección de referencia 7.1). El log de la fuerza necesaria para retirar la pata sana (derecha) se dividió entre el log de la fuerza necesaria para retirar la pata operada (izquierda). El cálculo presenta los valores de las patas en el estado sano próximo a 1 cuando la relación entre la fuerza de cada pata es similar. El aumento en los valores presenta un estado más doloroso (Figuras 19, 20 y 21.)

Resultados de Von Frey calculados por división del log: Cuando se compara cada grupo de tratamiento con el grupo de vehículo de control en cada momento de tiempo, los grupos de tratamiento mostraron alivio significativo del dolor del siguiente modo:

Los animales tratados con células a una baja concentración (grupo 1M) mostraron alivio significativo del dolor en los días de estudio 7, 10, 26 y 30 en comparación con el grupo de vehículo tratado (grupo 4M): $1,10 \pm 0,03$ frente a $1,17 \pm 0,02$ en el grupo 4M en el día de estudio 7 ($p < 0,05$).

Los animales tratados con células a una concentración media (grupo 2M) mostraron alivio significativo del dolor en los días de estudio 7, 10 y 26 con $p < 0,05$ y en los días de estudio 17 y 30 con $p < 0,01$ en comparación con el grupo de vehículo tratado (grupo 4M): $1,10 \pm 0,02$ frente a $1,17 \pm 0,02$ en el grupo 4M en el día de estudio 7 ($p < 0,05$).

Los animales tratados con células a una concentración alta (grupo 3M) mostraron alivio significativo del dolor en los días de estudio 7, 21, 26 y 30 en comparación con el grupo de vehículo tratado (grupo 4M): $1,07 \pm 0,02$ frente a $1,17 \pm 0,02$ en el grupo 4M en el día de estudio 7 ($p < 0,01$).

El tratamiento con el producto de control positivo, gabapentina (grupo 5M), fue activo como compuesto de alivio del dolor durante todos los días de prueba en comparación con el grupo de vehículo tratado: $1,04 \pm 0,02$ frente a $1,17 \pm 0,02$ en el grupo 4M en el día de estudio 7 ($p < 0,01$).

Resultados de Von Frey calculados por simples restas: Los resultados de Von Frey también se calcularon usando una simple resta: La fuerza necesaria para retirar la pata sana derecha menos la fuerza necesaria para retirar la pata dolorosa izquierda.

La comparación de valores de Von Frey para cada grupo de tratamiento con el grupo de vehículo de control en cada momento de tiempo mostró alivio significativo del dolor del siguiente modo.

Los animales tratados con células a una concentración baja (grupo 1M) mostraron alivio significativo del dolor en el día de estudio 7 ($p<0,05$) y en los días de estudio 10 y 26 ($p<0,01$) en comparación con el grupo de vehículo tratado (grupo 4M): $15,67 \pm 6,18$ g frente a $40,25 \pm 5,82$ g en el grupo 4M en el día de estudio 10 ($p<0,01$). Los animales tratados con células a una concentración media (grupo 2M) mostraron alivio significativo del dolor en los días de estudio 7, 10 y 17 ($p<0,05$) y en el día de estudio 30 ($p<0,01$) en comparación con el grupo de vehículo tratado (grupo 4M): $17,33 \pm 6,73$ g frente a $40,25 \pm 5,82$ g en el grupo 4M en el día de estudio 10 ($p<0,05$). Los animales tratados con células a una concentración alta (grupo 3M) mostraron alivio significativo del dolor en los días de estudio 7, 21, 26 y 30 ($p<0,01$) en comparación con el grupo de vehículo tratado (grupo 4M): $18,83 \pm 8,25$ g frente a $46,67 \pm 2,68$ g en el grupo 4M en el día de estudio 26 ($p<0,01$). El tratamiento con el producto de control positivo, gabapentina (grupo 5M), fue activo como compuesto de alivio del dolor durante todos los días de prueba en comparación con el grupo de vehículo tratado (grupo 4M): $7,92 \pm 5,35$ g frente a $40,25 \pm 5,82$ g en el grupo 4M en el día de estudio 10 ($p<0,01$).

Resultados de Von Frey calculados por simples restas frente a pretratamiento: La comparación de Valores de Von Frey para cada grupo de tratamiento en cada momento de tiempo con los valores de Von Frey de pretratamiento medidos en el día de estudio 5 mostraron alivio significativo del dolor del siguiente modo. Los animales tratados con células a una concentración baja (grupo 1 M) mostraron alivio significativo del dolor en los días de estudio 7, 21 y 26 ($p<0,05$) y en los días de estudio 10, 14 y 17 ($p<0,01$) en comparación con el mismo grupo en el día de estudio 5 antes del tratamiento: $28,08 \pm 7,30$ g en el día de estudio 7 frente a $46,67 \pm 2,79$ g en el día de estudio 5 ($p<0,05$). Los animales tratados con células a una concentración media (grupo 2M) tuvieron alivio significativo del dolor en los días de estudio 14 ($p<0,05$) y en los días de estudio 10, 17 y 30 ($p<0,011$) en comparación con el mismo grupo en el día de estudio 5 antes del tratamiento: $17,33 \pm 6,73$ g en el día de estudio 10 frente a $47,25 \pm 2,77$ g en el día de estudio 5 ($p<0,01$). Los animales tratados con células a una concentración alta (grupo 3M) tuvieron alivio significativo del dolor durante todos los días de prueba (7, 10, 14, 17, 21, 26, 30) en comparación con el mismo grupo en el día de estudio 5 antes del tratamiento: $23,58 \pm 6,26$ g en el día de estudio 7 frente a $46,58 \pm 2,30$ g en el día de estudio 5 ($p<0,01$).

El tratamiento con el producto de control positivo, gabapentina (grupo 5M), tuvo alivio significativo del dolor durante todos los días de prueba en comparación con el mismo grupo en el día de estudio 5 antes del tratamiento: $14,92 \pm 6,46$ g en el día de estudio 7 frente a $45,17 \pm 3,66$ g en el día de estudio 5 ($p<0,01$).

En vista de los hallazgos obtenidos en las condiciones de este estudio y confinados a los datos *in vivo*, hUTC a baja, media y alta dosis fueron eficaces como productos analgésicos para el dolor como se refleja en los parámetros de la prueba de Von Frey.

EJEMPLO 5

Aislamiento de células

Aislamiento de células umbilicales. Se obtuvieron cordones umbilicales de National Disease Research Interchange (NDRI, Filadelfia, Pa.). Los tejidos se obtuvieron tras partos normales. Los protocolos de aislamiento de células se realizaron asépticamente en una campana de flujo laminar. Para eliminar sangre y residuos, el cordón se lavó en solución salina tamponada con fosfato (PBS; Invitrogen, Carlsbad, Ca.) en presencia de penicilina a 100 unidades/mililitro, estreptomycin a 100 miligramos/mililitro y anfotericina B a 0,25 microgramos/mililitro (Invitrogen, Carlsbad, Ca.). Entonces, los tejidos se disociaron mecánicamente en placas de cultivo de tejido de 150 cm^2 en presencia de 50 mililitros de medio (DMEM-baja glucosa y DMEM-alta glucosa; Invitrogen) hasta que el tejido se troceó en una pulpa fina. Los tejidos picados se transfirieron a tubos cónicos de 50 mililitros (aproximadamente 5 gramos de tejido por tubo).

Entonces, el tejido se digirió en tanto medio DMEM-baja glucosa como medio DMEM-alta glucosa, conteniendo cada uno penicilina a 100 unidades/mililitro, estreptomycin a 100 miligramos/mililitro, anfotericina B a 0,25 microgramos/mililitro y las enzimas de digestión. En algunos experimentos se usó una mezcla de enzimas de colagenasa y dispasa ("C:D") (colagenasa (Sigma, St Louis, Mo.), 500 unidades/mililitro; y dispasa (Invitrogen), 50 unidades/mililitro, en medio DMEM-baja glucosa). En otros experimentos se usó una mezcla de colagenasa, dispasa e hialuronidasa ("C:D:H") (C:D:H = colagenasa, 500 unidades/mililitro; dispasa, 50 unidades/mililitro; e hialuronidasa (Sigma), 5 unidades/mililitro, en DMEM-baja glucosa). Los tubos cónicos que contenían el tejido, medio y enzimas de digestión se incubaron a 37°C en un agitador orbital (Enviro, Brooklyn, N.Y.) a 225 rpm durante 2 h.

Después de la digestión, los tejidos se centrifugaron a $150 \times g$ durante 5 minutos, el sobrenadante se aspiró. El sedimento se resuspendió en 20 mililitros de medio de crecimiento (DMEM:baja glucosa (Invitrogen), 15 por ciento (v/v) de suero bovino fetal (SBF; suero bovino fetal definido; lote nº AND 18475; Hyclone, Logan, Ut.), 0,001 % (v/v) de 2-mercaptoetanol (Sigma), penicilina a 100 unidades por mililitro, estreptomycin a 100 microgramos por mililitro y anfotericina B a 0,25 microgramos por mililitro (cada uno de Invitrogen, Carlsbad, Ca)). La suspensión de células se filtró a través un filtro de células BD FALCON de nailon de 70 micrómetros (BD Biosciences, San Jose, Ca.). Un aclarado adicional de 5 mililitros que comprendía medio de crecimiento se pasó a través del tamiz. La suspensión de

células se pasó entonces a través de un filtro de células de nailon de 40 micrómetros (BD Biosciences, San Jose, CA) y se siguió con un aclarado de 5 mililitros adicionales de medio de crecimiento.

5 El filtrado se resuspendió en medio de crecimiento (volumen total 50 mililitros) y se centrifugó a 150 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se aspiró y las células se resuspendieron en 50 mililitros de medio de crecimiento fresco. Este procedimiento se repitió dos veces más.

10 Después de la centrifugación final, el sobrenadante se aspiró y el sedimento de células se resuspendió en 5 mililitros de medio de crecimiento fresco. El número de células viables se determinó usando tinción con azul de tripano. Entonces, las células se cultivaron bajo condiciones estándar.

15 Las células aisladas de tejido de cordones umbilicales se sembraron a 5.000 células/cm² sobre matraces T-75 recubiertos con gelatina (Corning Inc., Corning, N.Y.) en medio de crecimiento. Después de dos días, el medio gastado y las células no adheridas se aspiraron de los matraces. Las células adherentes se lavaron con PBS tres veces para eliminar el residuo y las células derivadas de la sangre. Entonces, las células se rellenaron con medio de crecimiento y se dejó que crecieran hasta confluencia (aproximadamente 10 días desde el pase 0 (al pase 1). En pases posteriores (del pase 1 a 2, etc.), las células alcanzaron la sub-confluencia (75-85 por ciento de confluencia) en 4-5 días. Para estos pases posteriores, las células se sembraron a 5.000 células/cm². Las células se cultivaron en una estufa de incubación humidificada con 5 por ciento de dióxido de carbono a 37 °C.

20 En algunos experimentos, las células se aislaron de tejido de cordones umbilicales en medio DMEM-baja glucosa después de digerirse con LIBERASE™ (2,5 miligramos por mililitro, Blendzyme 3; Roche Applied Sciences, Indianápolis, IN) e hialuronidasa (5 unidades/mililitro, Sigma). La digestión del tejido y aislamiento de las células fue como se ha descrito anteriormente para otras digestiones con proteasa, sin embargo, se usó la mezcla de LIBERASE™/hialuronidasa en lugar de la mezcla de enzimas C:D o C:D:H. La digestión de tejido con LIBERASE™ produjo el aislamiento de poblaciones de células de tejidos postparto que se expandieron fácilmente.

30 Se compararon procedimientos para aislar células del cordón umbilical usando diferentes combinaciones de enzimas. Las enzimas comparadas para la digestión incluyeron: i) collagenasa; ii) dispasa; iii) hialuronidasa; iv) mezcla de collagenasa:dispasa (C:D); v) mezcla de collagenasa:hialuronidasa (C:H); vi) mezcla de dispasa:hialuronidasa (D:H); y vii) mezcla de collagenasa:dispasa:hialuronidasa (C:D:H). Se observaron diferencias en el aislamiento de células que utilizan estas condiciones de digestión enzimática diferentes (Tabla 4-1).

35 Se hicieron otros intentos para aislar conjuntos de células de cordón umbilical por diferentes enfoques. En un caso, el cordón umbilical se rebanó y se lavó con medio de crecimiento para desplazar los coágulos de sangre y material gelatinoso. La mezcla de sangre, material gelatinoso y medio de crecimiento se recogió y se centrifugó a 150 x g. El sedimento se resuspendió y se sembró sobre matraces recubiertos con gelatina en medio de crecimiento. De estos experimentos se aisló una población de células que se expandió fácilmente.

40 También se han aislado células de muestras de sangre del cordón obtenidas de NDRI. El protocolo de aislamiento usado fue el de la solicitud de patente internacional PCT/US2002/029971 por Ho y col. Muestras (50 mililitros y 10,5 mililitros, respectivamente) de sangre del cordón umbilical (NDRI, Filadelfia Pa.) se mezclaron con tampón de lisis (esterilizado por filtración, cloruro de amonio 155 milimolar, bicarbonato potásico 10 milimolar, EDTA 0,1 milimolar tamponado a pH 7,2 (todos los componentes de Sigma, St. Louis, Mo.). Las células se lisaron a una relación de 1:20 de sangre del cordón con respecto a tampón de lisis. La suspensión de células resultante se agitó con vórtex durante 5 segundos y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente. El lisado se centrifugó (10 minutos a 200 x g). El sedimento de células se resuspendió en medio esencial mínimo completo (Gibco, Carlsbad Ca.) que contenía 10 por ciento de suero bovino fetal (Hyclone, Logan Ut.), glutamina 4 milimolar (Mediatech Herndon, Va.), penicilina a 100 unidades por mililitro y estreptomycin a 100 microgramos por mililitro (Gibco, Carlsbad, Ca.). Las células resuspendidas se centrifugaron (10 minutos a 200 x g), el sobrenadante se aspiró y el sedimento de células se lavó en medio completo. Las células se sembraron directamente en tanto matraces T75 (Corning, N.Y.), matraces T75 recubiertos con laminina como matraces T175 recubiertos con fibronectina (ambos de Becton Dickinson, Bedford, Ma.).

55 Para determinar si poblaciones de células podrían aislarse bajo condiciones diferentes y expandirse bajo una variedad de condiciones inmediatamente después del aislamiento, las células se digirieron en medio de crecimiento con o sin 0,001 por ciento (v/v) de 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, Mo.), usando la combinación de enzimas de C:D:H, según los procedimientos proporcionados anteriormente. Todas las células se cultivaron en presencia de penicilina a 100 unidades por mililitro y estreptomycin a 100 microgramos por mililitro. Bajo todas las condiciones probadas, las células se unieron y se expandieron bien entre el pase 0 y 1 (Tabla 4-2). Se demostró que las células en las condiciones 5-8 y 13-16 proliferaron bien hasta 4 pases después de la siembra, momento en el que se criopreservaron.

65 La combinación de C:D:H proporcionó el mejor rendimiento de células tras el aislamiento, y generó células que se expandieron durante muchas más generaciones en cultivo que las otras condiciones (Tabla 4-1). No se obtuvo una población de células expandibles usando collagenasa o hialuronidasa sola. No se hizo intento de determinar si este

resultado es específico para la collagenasa que se probó.

Tabla 4-1: Aislamiento de células de tejido del cordón umbilical usando combinaciones de enzimas variables

Enzima digestiva	Célula aislada	Expansión celular
Colagenasa	x	X
Dispasa	+ (>10 h)	+
Hialuronidasa	x	X
Colagenasa: Dispasa	++ (<3 h)	++
Colagenasa: Hialuronidasa	++ (<3 h)	+
Dispasa: Hialuronidasa	+ (>10 h)	+
Colagenasa :Dispasa: Hialuronidasa	+++ (<3 h)	+++
Clave: + = buena, ++ = muy buena, +++ = excelente, X = sin éxito		

Las células se unieron y se expandieron bien entre el pase 0 y 1 bajo todas las condiciones probadas para la digestión y crecimiento de enzimas (Tabla 4-2). Las células en las condiciones experimentales 5-8 y 13-16 proliferaron bien hasta 4 pases después de la siembra, momento en el que se criopreservaron. Todas las células se criopreservaron para el posterior análisis.

Tabla 4-2: Aislamiento y expansión del cultivo de células postparto bajo condiciones variables:

Condición	Media	15% FBS	BME	Gelatina	20% O ₂	Factores de crecimiento
1	DMEM-Lg	Y	Y	Y	Y	N
2	DMEM-Lg	Y	Y	Y	N (5%)	N
3	DMEM-Lg	Y	Y	N	Y	N
4	DMEM-Lg	Y	Y	N	N (5%)	N
5	DMEM-Lg	N (2%)	Y	N (Lamina)	Y	EGF/FGF (20 ng/ml)
6	DMEM-Lg	N (2%)	Y	N (Lamina)	N (5%)	EGF/FGF (20 ng/ml)
7	DMEM-Lg	N (2%)	Y	N (Fibronectina)	Y	PDGFNEGF
8	DMEM-Lg	N (2%)	Y	N (Fibronectina)	N (5%)	PDGFNEGF
9	DMEM-Lg	Y	N	Y	Y	N
10	DMEM-Lg	Y	N	Y	N (5%)	N
11	DMEM-Lg	Y	N	N	Y	N
12	DMEM-Lg	Y	N	N	N (5%)	N
13	DMEM-Lg	N (2%)	N	N (Lamina)	Y	EGF/FGF (20 ng/ml)
14	DMEM-Lg	N (2%)	N	N (Lamina)	N (5%)	EGF/FGF (20 ng/ml)
15	DMEM-Lg	N (2%)	N	N (Fibronectina)	Y	PDGFNEGF
16	DMEM-Lg	N (2%)	N	N (Fibronectina)	N (5%)	PDGFNEGF

Las células nucleadas se unieron y crecieron rápidamente. Estas células se analizaron por citometría de flujo y fueron similares a las células obtenidas por digestión enzimática.

Las preparaciones contuvieron glóbulos rojos y plaquetas. Las células no nucleadas se unieron y dividieron durante las 3 primeras semanas. El medio se cambió 3 semanas después de la siembra y no se observó que se unieran y crecieran células.

Podrían aislarse eficazmente poblaciones de células de tejido umbilical usando la combinación de enzimas collagenasa (una metaloproteasa), dispasa (proteasa neutra) e hialuronidasa (enzima mucolítica que degrada el ácido hialurónico). También puede usarse LIBERASE, que es una mezcla de collagenasa y una proteasa neutra. También se usó Blendzyme 3, que es collagenasa (4 unidades de Wunsch /gramo) y termolisina (1714 unidades de caseína/gramo), junto con hialuronidasa para aislar células. Estas células se expandieron fácilmente durante muchos pases cuando se cultivaron en medio de expansión de crecimiento sobre plástico recubierto con gelatina.

También se aislaron células de sangre residual en los cordones, pero sangre de cordón. La presencia de células en los coágulos de sangre lavados del tejido, que se adhieren y crecen en las condiciones usadas, puede ser debida a células que se liberan durante el proceso de disección.

EJEMPLO 6

Características de crecimiento de células

El potencial de expansión de las células de células derivadas de tejido del cordón umbilical se comparó con otras poblaciones de citoblastos aislados. El proceso de expansión de células hasta la senescencia se denomina límite de Hayflick (Hayflick L., J. Am. Geriatr. Soc. 1974; 22(1):1-12; Hayflick L., Gerontologist, 1974; 14(1):37-45).

Se recubrieron matraces de plástico de cultivo de tejido añadiendo 20 mililitros de gelatina al 2 % (peso/volumen) (Tipo B: 225 Bloom; Sigma, St Louis, Mo.) a un matraz T75 (Corning Inc., Corning, N.Y.) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de eliminar la disolución de gelatina, se añadieron 10 mililitros de solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Invitrogen, Carlsbad, Ca.) y luego se aspiraron.

Para comparación del potencial de expansión del crecimiento se utilizaron las siguientes poblaciones de células; i) citoblastos mesenquimatosos (MSC; Cambrex, Walkersville, Md.); ii) células derivadas de adiposas (patente de EE.UU. nº 6.555.374 B1; solicitud de patente de EE.UU. US20040058412); iii) fibroblastos de piel dérmica normal (cc-2509 lote nº 9F0844; Cambrex, Walkersville, Md.); y iv) células derivadas del umbilical. Las células se sembraron inicialmente a 5.000 células/cm² sobre matraces T75 recubiertos con gelatina en medio de crecimiento. Para los pases posteriores, los cultivos celulares se trataron del siguiente modo. Después de la tripsinización, las células viables se contaron después de la tinción con azul de tripano. La suspensión de células (50 microlitros) se combinó con azul de tripano (50 microlitros, Sigma, St. Louis Mo.). Se estimaron números de células viables usando un hemocitómetro.

Tras el recuento, las células se sembraron a 5.000 células/cm² sobre matraces T75 recubiertos con gelatina en 25 mililitros de medio de crecimiento fresco. Las células se cultivaron en una atmósfera estándar (5 por ciento de dióxido de carbono (v/v)) a 37 °C. El medio de crecimiento se cambió dos veces por semana. Cuando las células alcanzaron aproximadamente el 85 por ciento de confluencia se sometieron a pases; este procedimiento se repitió hasta que las células alcanzaron la senescencia.

En cada pase, las células se tripsinaron y se contaron. Se calcularon el rendimiento de células viables, duplicaciones de la población [en (células finales/células iniciales)/ln2] y el tiempo de duplicación (tiempo en cultivo/duplicación de la población). Para los fines de determinar la expansión de células óptima, el rendimiento de células total por pase se determinó multiplicando el rendimiento total para el pase previo por el factor de expansión para cada pase (es decir, factor de expansión = células finales/células iniciales).

También se probó el potencial de expansión de células del banco en el pase 10. Se usó un conjunto diferente de condiciones. Se probaron fibroblastos de piel dérmica normal (cc-2509 lote nº 9F0844; Cambrex, Walkersville, Md.), células derivadas del umbilical. Estas poblaciones de células se habían guardado en el banco en el pase 10 previamente, que se habían cultivado a 5.000 células/cm² en cada pase hasta ese punto. Se determinó el efecto de la densidad celular sobre las poblaciones de células tras la descongelación de las células en el pase 10. Las células se descongelaron bajo condiciones estándar y se contaron usando tinción con azul de tripano. Entonces, las células descongeladas se sembraron a 1.000 células/cm² en medio de crecimiento. Las células se cultivaron bajo condiciones atmosféricas estándar a 37 °C. El medio de crecimiento se cambió dos veces a la semana. Las células se sometieron a pases a medida que alcanzaron aproximadamente el 85 % de confluencia. Las células se sometieron posteriormente a pases hasta la senescencia, es decir, hasta que no pudieron expandirse más. Las células se tripsinaron y se contaron en cada pase. Se calcularon el rendimiento de células, duplicación de la población (en (células finales/células iniciales)/ln2) y el tiempo de duplicación (tiempo en cultivo)/duplicación de la población). El rendimiento de células totales por pase se determinó multiplicando el rendimiento total para el pase previo por el factor de expansión para cada pase (es decir, factor de expansión = células finales/células iniciales).

El potencial de expansión de cultivos celulares derivados de tejido derivado de cordón umbilical recientemente aislado bajo condiciones de siembra a bajas células se probó en otro experimento. Las células derivadas del umbilical se aislaron como se ha descrito en el Ejemplo 4. Las células se sembraron a 1.000 células/cm² y se sometieron a pases como se ha descrito anteriormente hasta la senescencia. Las células se cultivaron bajo condiciones atmosféricas estándar a 37 °C. El medio de crecimiento se cambió dos veces por semana. Las células se sometieron a pases a medida que alcanzaban aproximadamente el 85 % de confluencia. En cada pase, las células se tripsinaron y se contaron por tinción con azul de tripano. Se calcularon el rendimiento de células, duplicación de la población (en (células finales/células iniciales)/ln2) y el tiempo de duplicación (tiempo en cultivo)/duplicación de la población) para cada pase. El rendimiento de células totales por pase se determinó multiplicando el rendimiento total para el pase previo por el factor de expansión para cada pase (es decir, factor de expansión = células finales/células iniciales). Las células se cultivaron sobre matraces recubiertos con gelatina y de no gelatina.

Se ha demostrado que las condiciones de cultivo celular a bajo O₂ pueden mejorar la expansión de células en ciertas circunstancias (publicación de EE.UU. número US20040005704). Con el fin de determinar si la expansión de células de células derivadas del umbilical podría mejorarse alterando las condiciones del cultivo celular, cultivos de células derivadas del umbilical se cultivaron en condiciones de bajo oxígeno. Las células se sembraron a 5.000 células/cm² en medio de crecimiento sobre matraces recubiertos con gelatina. Las células se cultivaron inicialmente bajo

condiciones atmosféricas estándar hasta el pase 5, momento en el que se transfirieron a condiciones de cultivo de bajo oxígeno (5 % de O₂).

En otros experimentos, las células se expandieron sobre placas no recubiertas, recubiertas con colágeno, recubiertas con fibronectina, recubiertas con laminina y recubiertas con Matrigel. Se ha demostrado que los cultivos se expanden bien sobre estas matrices diferentes.

Células derivadas del umbilical se expandieron durante más de 40 pases generando campos de células de > 1 E17 células en 60 días. A diferencia, los MSC y los fibroblastos alcanzaron la senescencia después de < 25 días y < 60 días, respectivamente. Aunque tanto las células derivadas de adiposas como omentales se expandieron durante casi 60 días, generaron rendimientos de células totales de $4,5 \times 10^{12}$ y $4,24 \times 10^{13}$, respectivamente. Así, cuando se sembraron a 5.000 células/cm² bajo las condiciones experimentales utilizadas, las células derivadas del umbilical se expandieron mucho mejor que los otros tipos de células cultivadas bajo las mismas condiciones (Tabla 6-1).

Tabla 6-1: Características de crecimiento para diferentes poblaciones de células cultivadas hasta la senescencia

Celula tipo	Senescencia	Duplicaciones totales de población	Rendimiento (Total células)
MSC	24d	8	4.72 E7
Células adiposas-derivadas	57d	24	4.5 E12
Fibroblasts	53d	26	2.82 E13
Umbilical	65d	42	6.15 E17

Las células derivadas del umbilical y células de fibroblasto se expandieron durante más de 10 pases generando rendimientos de células de > 1E11 células en 60 días (6-2). Después de 60 días bajo estas condiciones, los fibroblastos alcanzaron la senescencia; mientras, las células derivadas del umbilical alcanzaron la senescencia después de 80 días, completando >50 duplicaciones de la población.

Tabla 6-2: Características de crecimiento para diferentes poblaciones de células usando expansión del crecimiento a baja densidad del pase 10 hasta la senescencia

Celula tipo (Pasaje No.)	Senescencia	Duplicaciones totales de población	Rendimiento (Total células)
Fibroblasts (P10)	80 días	43.68	2.59 E11
Umbilical (P10)	80 días	53.6	1.25 E14

Las células se expandieron bien bajo las condiciones de oxígeno reducido, sin embargo, el cultivo bajo condiciones de bajo oxígeno no parece tener un efecto significativo sobre la expansión de células para células derivadas de tejido del cordón umbilical. Condiciones atmosféricas estándar ya han demostrado ser satisfactorias para cultivar números suficientes de células, y no se requiere cultivo de bajo oxígeno para el crecimiento de células derivadas de tejido del cordón umbilical.

Las actuales condiciones de expansión de células de células derivadas de tejido del cordón umbilical aisladas en crecimiento a densidades de aproximadamente 5.000 células/cm², en medio de crecimiento sobre matraces recubiertos con gelatina o no recubiertos, bajo oxígeno atmosférico estándar, son suficientes para generar grandes números de células en el pase 11. Además, los datos sugieren que las células pueden expandirse fácilmente usando condiciones de cultivo de menor densidad (por ejemplo, 1.000 células/cm²). La expansión de células derivadas de tejido del cordón umbilical en condiciones de bajo oxígeno también facilita la expansión de células, aunque todavía no se ha observado mejora incremental en el potencial de expansión de células si se utilizan estas condiciones para el crecimiento. Actualmente, se prefiere cultivar células derivadas de tejido del cordón umbilical bajo condiciones atmosféricas estándar para generar grandes conjuntos de células. Si las condiciones de cultivo se alteran, sin embargo, la expansión de células derivadas de tejido del cordón umbilical pueden asimismo alterarse. Esta estrategia puede usarse para potenciar la capacidad proliferativa y diferenciadora de estas poblaciones de células.

En las condiciones utilizadas, aunque el potencial de expansión de MSC y células derivadas de adiposas es limitado, las células derivadas de tejido del cordón umbilical se expanden fácilmente a grandes números.

EJEMPLO 7

Crecimiento de células en medio que contiene D-valina

Se ha informado que puede usarse medio que contiene D-valina en lugar de la isoforma de L-valina normal para inhibir selectivamente el crecimiento de células similares a fibroblastos en cultivo (Hongpaisan, Cell Biol Int., 2000; 24:1-7; Sordillo y col., Cell Biol Int Rep., 1988; 12:355-64). Se realizaron experimentos para determinar si las células derivadas de tejido del cordón umbilical podrían cultivarse en medio que contiene D-valina.

Se sembraron células derivadas del umbilical (P5) y fibroblastos (P9) a 5.000 células/cm² en matraces T75 recubiertos con gelatina (Corning, Corning, N.Y.). Después de 24 horas, el medio se eliminó y las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco, Carlsbad, Ca.) para eliminar el medio residual. El medio se sustituyó con un medio de crecimiento modificado (DMEM con D-valina (Gibco de pedido especial), 15 % (v/v) de suero bovino fetal dializado (Hyclone, Logan, Ut.), 0,001 % (v/v) de beta-mercaptoetanol (Sigma), penicilina a 50 unidades/mililitro y estreptomycin a 50 miligramos/mililitro (Gibco)).

Células derivadas del umbilical y células de fibroblasto sembradas en el medio que contiene D-valina no proliferaron, a diferencia de células sembradas en medio de crecimiento que contenía suero dializado. Las células de fibroblastos cambiaron morfológicamente, aumentando en tamaño y cambiando en forma. Todas las células murieron y con el tiempo se desprendieron de la superficie del matraz después de cuatro semanas. Así, puede llegarse a la conclusión de que células derivadas de tejido del cordón umbilical requieren L-valina para el crecimiento celular y para mantener la viabilidad a largo plazo. La L-valina no se elimina preferentemente del medio de crecimiento para células derivadas de tejido del cordón umbilical.

EJEMPLO 8

Análisis de cariotipo de células

Las líneas celulares usadas en la terapia celular son preferentemente homogéneas y libres de cualquier tipo de célula contaminante. Las células humanas usadas en la terapia celular deben tener un número normal (46) de cromosomas con estructura normal. Para identificar líneas de células derivadas de tejido del cordón umbilical que son homogéneas y libres de células de origen de tejido no postparto, se analizaron los cariotipos de muestras de células.

Se cultivaron células derivadas de tejido del cordón umbilical de tejido postparto de un neonato masculino en medio de crecimiento. Se seleccionó tejido del cordón umbilical de un neonato masculino (X,Y) para permitir la distinción entre células derivadas de neonato y células derivadas de la madre (X,X). Las células se sembraron a 5.000 células por centímetro cuadrado en medio de crecimiento en un matraz T25 (Corning, Corning, N.Y.) y se expandieron al 80 % de confluencia. Un matraz T25 que contiene células se llenó hasta el cuello con medio de crecimiento. Las muestras se entregaron a un laboratorio clínico de citogenética por mensajería (el tiempo de transporte estimado de laboratorio a laboratorio es una hora). Se realizó análisis cromosómico por el Centro de Genética Humana y Molecular de la Escuela Médica de Nueva Jersey, Newark, N.J. Las células se analizaron durante la metafase cuando los cromosomas se visualizan mejor. De veinte células contadas en la metafase, cinco se analizaron para el número de cariotipo homogéneo normal (dos). Una muestra de células se caracterizó como homogénea si se observaron dos cariotipos. Una muestra de células se caracterizó como heterogénea si se observaron más de dos cariotipos. Se contaron células en metafase adicionales y se analizaron cuando se identificó un número de cariotipo heterogéneo (cuatro).

El personal del laboratorio de citogenética interpretó que todas las muestras de células enviadas para el análisis cromosómico presentaban un aspecto normal. Tres de las dieciséis líneas celulares analizadas presentaron un fenotipo heterogéneo (XX y XY), que indica la presencia de células derivadas de tanto orígenes neonatales como maternos (Tabla 8-1). Cada una de las muestras de células se caracterizó como homogénea (Tabla 8-1).

Tabla 8-1. Resultados del cariotipo de células derivadas de tejido del cordón umbilical.

Tejido	Pasaje	Células contadas metafase	Células analizadas metafase	Nº de cariotipos	ISCN Kariotipo
Umbilical	23	20	5	2	46, XX
Umbilical	6	20	5	2	46, XY
Umbilical	3	20	5	2	46, XX
Clave: N- parte Neonatal; V- region vellosa; M- parte maternal; C- clon					

El análisis cromosómico identifica células derivadas del umbilical cuyos cariotipos parecen normales como se ha interpretado por un laboratorio citogenético clínico. El análisis del cariotipo también identificó líneas celulares libres de células maternas, como se ha determinado por cariotipo homogéneo.

EJEMPLO 9

Evaluación por citometría de flujo de marcadores de la superficie celular

La caracterización de proteínas de la superficie celular o "marcadores" por citometría de flujo puede usarse para determinar una identidad de la línea celular. La coherencia de la expresión puede determinarse a partir de múltiples donantes, y en células expuestas a diferentes condiciones de procesamiento y cultivo. Las líneas celulares aisladas del umbilical se caracterizaron por citometría de flujo, proporcionando un perfil para la identificación de estas líneas celulares.

Las células se cultivaron en medio de crecimiento, en matraces de cultivo de tejido T75, T150 y T225 tratados con plasma (Corning, Corning, N.Y.) hasta la confluencia. Las superficies de crecimiento de los matraces se recubrieron con gelatina incubando 2 % (peso/volumen) de gelatina (Sigma, St. Louis, Mo.) durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Las células adherentes en matraces se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS); (Gibco, Carlsbad, Mo.) y se desprendieron con tripsina/EDTA (Gibco). Las células se recogieron, se centrifugaron y se resuspendieron en 3 % (v/v) de SBF en PBS a una concentración de célula de 1×10^7 por mililitro. Según las especificaciones del fabricante, se añadió anticuerpo para el marcador de superficie celular de interés (véase más adelante) a 100 microlitros de suspensión de células y la mezcla se incubó en la oscuridad durante 30 minutos a 4 °C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar el anticuerpo no unido. Las células se resuspendieron en 500 microlitros de PBS y se analizaron por citometría de flujo. El análisis de citometría de flujo se realizó con un instrumento FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, Ca.).

Se usaron los siguientes anticuerpos para marcadores de la superficie celular.

Tabla 9-1: Anticuerpos usados en caracterizar marcadores de la superficie celular de una UDC.

Anticuerpo	Manufacturado	No. de Catálogo
CD10	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555375
CD13	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555394
CD31	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555446
CD34	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555821
CD44	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555478
CD45RA	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555489
CD73	BD Pharmingen (San Diego, CA)	550257
CD90	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555596
CD117	BD Biosciences (San Jose, CA)	340529
CD141	BD Pharmingen (San Diego, CA)	559781
PDGFr-alpha	BD Pharmingen (San Diego, CA)	556002
HLA-A, B, C	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555553
HLA-DR, DP, DQ	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555558
IgG-FITC	Sigma (St. Louis, MO)	F-6522
IgG- PE	Sigma (St. Louis, MO)	P-4685

Las células del cordón umbilical se analizaron en los pases 8, 15 y 20.

Para comparar diferencias entre donantes, las células derivadas del cordón umbilical de diferentes donantes se compararon entre sí.

Las células derivadas del cordón umbilical cultivadas sobre matraces recubiertos con gelatina se compararon con células derivadas del cordón umbilical cultivadas sobre matraces no recubiertos.

Se compararon los cuatro tratamientos usados para el aislamiento y preparación de células. Se compararon células derivadas de tejido postparto mediante tratamiento con: (1) colagenasa; (2) colagenasa/dispasa; (3) colagenasa/hialuronidasa; y (4) colagenasa/hialuronidasa/dispasa.

Se analizaron células derivadas del cordón umbilical en el pase 8, 15 y 20 por citometría de flujo todos los CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C expresados, indicado por elevada fluorescencia con respecto al control de IgG. Estas células fueron negativas para CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR, DP, DQ, indicado por valores de fluorescencia de acuerdo con el control de IgG.

Las células derivadas del cordón umbilical aisladas de donantes separados analizados por citometría de flujo dieron cada una positivo para la producción de CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, reflejado en los elevados valores de fluorescencia con respecto al control de IgG. Estas células fueron negativas para la producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR, DP, DQ con valores de fluorescencia de acuerdo con el control de IgG.

Las células derivadas del cordón umbilical expandidas sobre matraces recubiertos y no recubiertos con gelatina por citometría de flujo fueron todas positivas para la producción de CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, con elevados valores de fluorescencia con respecto al control de IgG. Estas células fueron negativas para la producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR, DP, DQ, con valores de fluorescencia de acuerdo con el control de IgG.

El análisis de células derivadas del cordón umbilical por citometría de flujo ha establecido una identidad de estas líneas celulares. Estas células derivadas del cordón umbilical fueron positivas para CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C; y negativas para CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR, DP, DQ. Esta identidad fue coherente entre variaciones en variables que incluyen el donante, pase, recubrimiento de la superficie del recipiente de cultivo, enzimas de digestión y capa placentaria. Se observó alguna variación en las medias e intervalos de la curva del histograma de valores de fluorescencia individuales, pero todas las curvas positivas bajo todas las condiciones probadas fueron normales y expresaron valores de fluorescencia superiores al control de IgG, confirmando así que las células comprenden una población homogénea que tiene expresión positiva de los marcadores.

EJEMPLO 10

Análisis de células por matriz de oligonucleótidos

Se usaron matrices de oligonucleótidos para comparar perfiles de expresión génica de células derivadas del umbilical y derivadas de la placenta con fibroblastos, citoblastos mesenquimatosos humanos, y otra línea celular derivada de médula ósea humana. Este análisis proporciona una caracterización de las células derivadas de postparto e identificó marcadores moleculares únicos para estas células.

Células derivadas de postparto. Se obtuvieron cordones umbilicales humanos y placenta del National Disease Research Interchange (NDRI, Filadelfia, Pa.) de partos a término normales con el consentimiento de las pacientes. Se recibieron los tejidos y las células se aislaron como se ha descrito en el Ejemplo 4 después de la digestión con una mezcla de C:D:H. Las células se cultivaron en medio de crecimiento sobre matraces de cultivo de tejido de plástico recubiertos con gelatina. Los cultivos se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂.

Fibroblastos. Se compraron fibroblastos dérmicos humanos de Cambrex Incorporated (Walkersville, Md.; número de lote 9F0844) y ATCC CRL-1501 (CCD39SK). Ambas líneas se cultivaron en medio DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, Ca.) con 10 % (v/v) de suero bovino fetal (Hyclone) y penicilina/estreptomycin (Invitrogen)). Las células se cultivaron sobre plástico tratado con tejido estándar.

Citoblastos mesenquimatosos humanos (hMSC). Se compraron hMSC de Cambrex Incorporated (Walkersville, Md.; números de lote 2F1655, 2F1656 y 2F1657) y se cultivaron según las especificaciones de fabricante en medio MSCGM (Cambrex). Las células se cultivaron sobre plástico con cultivo de tejido estándar a 37 °C con 5 % de CO₂.

Células de médula ósea de la cresta ilíaca humanas (ICBM). Se recibió médula ósea de la cresta ilíaca humana de NDRI con consentimiento del paciente. La médula ósea se procesó según el procedimiento brevemente resumido por Ho y col. (documento WO03/025149). La médula ósea se mezcló con tampón de lisis (NH₄Cl 155 mM, KHCO₃ 10 mM y EDTA 0,1 mM, pH 7,2) a una relación de 1 parte de médula ósea a 20 partes de tampón de lisis. La suspensión de células se agitó con vórtex, se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó durante 10 minutos a 500 x g. El sobrenadante se desechó y el sedimento de células se resuspendió en medio esencial mínimo-alfa (Invitrogen) complementado con 10 % (v/v) de suero bovino fetal y glutamina 4 mM. Las células se centrifugaron de nuevo y el sedimento de células se resuspendió en medio fresco. Las células mononucleares viables se contaron usando exclusión con azul de tripano (Sigma, St. Louis, Mo.). Las células mononucleares se sembraron en matraces de cultivo de tejido de plástico a 5 x 10⁴ células/cm². Las células se incubaron a 37 °C con 5

% de CO₂ a tanto O₂ atmosférico estándar como a 5 % de O₂. Las células se cultivaron durante 5 días sin un cambio de medio. Los medios y las células no adherentes se eliminaron después de 5 días de cultivo. Las células adherentes se mantuvieron en cultivo.

Se eliminaron cultivos de células que crecen activamente de los matraces con un raspador de células en solución salina tamponada con fosfato (PBS) fría. Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 300 x g. El sobrenadante se eliminó y las células se resuspendieron en PBS fresco y se centrifugaron de nuevo. El sobrenadante se eliminó y el sedimento de células se congeló inmediatamente y se guardó a -80 °C. Se extrajo ARNm celular y se transcribió en ADNc. Entonces, el ADNc se transcribió en ARNc y se marcó con biotina. El ARNc marcado con biotina se hibridó con matrices de oligonucleótidos GENECHIP HG-U133A de Affymetrix (Affymetrix, Santa Clara, Ca.). Las hibridaciones y la recogida de datos se realizaron según las especificaciones del fabricante. La hibridación y la recogida de datos se realizó según las especificaciones del fabricante. Los análisis de datos se realizaron usando el software informático "Significance Analysis of Microarrays" (SAM) versión 1.21 (Tusher, V.G. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001; 98:5116-5121).

Se analizaron diferentes poblaciones de células en este estudio. Las células junto con la información de pases, sustrato de cultivo y medios de cultivo se enumeran en la Tabla 9-1.

Tabla 10-1. Células analizadas por el estudio en micromatriz. Las líneas celulares se enumeran por su código de identificación junto con el pase en el momento del análisis, sustrato de crecimiento celular y medios de crecimiento.

Umbilical (022803)	2	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2BME
Umbilical (042103)	3	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2BME
Umbilical (071003)	4	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2BME
Placenta (042203)	12	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2BME
Placenta (042903)	4	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2BME
Placenta (071003)	3	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2BME
ICBM (070203) (5% O ₂)	3	Plástico	MEM 10% FBS
ICBM (062703) (std O ₂)	5	Plástico	MEM 10% FBS
ICBM (062703)(5% O ₂)	5	Plástico	MEM 10% FBS
hMSC (Lot 2F1655)	3	Plástico	MSCGM
hMSC (Lot 2F1656)	3	Plástico	MSCGM
hMSC (Lot 2F1657)	3	Plástico	MSCGM
hFibroblast (9F0844)	9	Plástico	DMEM-F12, 10% FBS
hFibroblast (CCD39SK)	4	Plástico	DMEM-F12, 10% FBS

Los datos se evaluaron por análisis de componentes principales con el software SAM como se ha descrito anteriormente. Los análisis revelaron 290 genes que se expresaron en cantidades relativas diferentes en las células probadas. Este análisis proporciona comparaciones relativas entre las poblaciones.

La Tabla 10-2 muestra las distancias euclídeas que se calcularon para la comparación de los pares de células. Las distancias euclídeas se basaron en la comparación de las células basándose en los 290 genes que se expresaron diferencialmente entre los tipos de células. La distancia euclídea es inversamente proporcional a la similitud entre la expresión de los 290 genes.

Tabla 10-2. Distancias euclídeas para los pares de células. Se calculó la distancia euclídea para los tipos de células usando los 290 genes que se expresaron diferencialmente entre los tipos de células. La similitud entre las células es inversamente proporcional a la distancia euclídea.

Pareja de células	Distancia euclidiana
ICBM-hMSC	24.71
Placenta-umbilical	25.52
ICBM-Fibroblast	36.44
ICBM-placenta	37.09
Fibroblast-MSC	39.63
ICBM-Umbilical	40.15
Fibroblast-Umbilical	41.59
MSC-Placenta	42.84
MSC-Umbilical	46.86
ICBM-placenta	48.41

Las Tablas 10-3, 10-4 y 10-5 muestran la expresión de genes elevada en células derivadas de tejido umbilical (Tabla 10-3) y células derivadas de la placenta (Tabla 10-4), elevada en y reducida en células derivadas del cordón umbilical y de placenta (Tabla 10-5).

Tabla 10-3. Genes que aumentaron específicamente en la expresión en células derivadas del cordón umbilical en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

Genes ingrementados en células umbilicus-derivadas		
Set de Prueba ID	Nombre del gen	NCBI N° de Acceso
202859_x_at	Interleukin 8	NM_000584
211506_s_at	Interleukin 8	AF043337
210222_s_at	reticulon 1	BC000314
204470_at	chemokina (C-X-C motif) ligando 1 (melanoma activación de estimulación de crecimiento)	NM_001511
206336_at	chemokina (C-X-C motif) ligando 6 (granulocito chemotactico proteina 2)	NM_002993
207850_at	chemokina (C-X-C motif) ligando 3	NM_002090
203485_at	reticulon 1	NM_021136
202644_s_at	factor de tumor necrosis, alpha-inducido Proteina 3	NM_006290

Tabla 10-4. Genes que aumentaron específicamente en la expresión en las células derivadas de la placenta en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

ES 2 520 393 T3

Genes ingrementados en células placenta-derivadas		
Set de Prueba ID	Nombre del gen	NCBI Nº de Acceso
209732_at	C-tipo (calcio dependiente, carbohidrato-recognition dominio) lectina, superfamilia miembro 2 (activationinducida)	AF070642
206067_s_at	Tumor Wilms 1	NM_024426
207016_s_at	aldehyde dehydrogenasa 1 familia, miembro A2	AB015228
206367_at	Renin	NM_000537
210004_at	oxidizada baja densidad lipoproteina (lectina-como) receptor 1	AF035776
214993_at	<i>Homo sapiens</i> , clon IMAGEN:4179671, mRNA, parcial cds	AF070642
202178_at	proteina kinasa C, zeta	NM_002744
209780_at	hipotetica proteina DKFZp564F013	AL136883
204135_at	regulado por disminución en el cáncer de ovario 1	NM_014890
213542_at	<i>Homo sapiens</i> mRNA; cDNA DKFZp547K1113 (desde clon DKFZp547K1113)	AI246730

Tabla 10-5. Genes que disminuyeron en expresión en las células derivadas del cordón umbilical y derivadas de la placenta en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

Genes ingrementados en células umbilicus-derivadas y placenta-derivadas		
Set de Prueba ID	Nombre del gen	NCBI N° de Acceso
210135_s_at	Homebox 2 de estatura corta	AF022654.1
205824_at	Golpe de calor 27kDa proteína 2	NM_001541.1
209687_at	chemokina(C-X-C motif) ligand o12 (de células estromales derivadas factor 1)	U19495.1
203666_at	chemokina(C-X-C motif) ligand o12 (de células estromales derivadas factor 1)	NM_000609.1
212670_at	Elastina (supraaórtica aórtica estenosis, Williams- Beuren síndrome)	AA479278
213381_at	<i>Homo sapiens</i> mRNA; cDNA DKFZp586M2022 (desde clon DKFZp586M2022)	N91149
206201_s_at	homeobox mesénquima 2 (detención de crecimiento específico homeobox)	NM_005924.1
205817_at	Sine homólogo homeobox oculis 1 (<i>Drosophila</i>)	NM_005982.1
209283_at	cristalina, alpha B	AF007162.1
212793_at	activador despeinado asociado de la morfogénesis 2	BF513244
213488_at	DKFZP586B2420 proteína	AL050143.1
209763_at	similar a neuralina 1	AL049176
205200_at	Tetranectina (plasminogen unión de proteína)	NM_003278.1
205743_at	src homología tres (SH3) y dominio rico en cisteína	NM_003149.1
200921_s_at	Gen de translocación de células B 1, anti-proliferativa	NM_001731.1
206932_at	colesterol 25-hidroxilasa	NM_003956.1
204198_s_at	factor de transcripción relacionados con runt-3	AA541630
219747_at	FLJ23191 proteína hipotética	NM_024574.1
204773_at	La interleucina 11 receptor, alfa	NM_004512.1
202465_at	Procolágeno C-endopeptidasa potenciador	NM_002593.2
203706_s_at	Homólogo Frizzled 7 (<i>Drosophila</i>)	NM_003507.1
212736_at	BC008967 hipotético gen	BE299456
214587_at	Colágeno de tipo VIII, alfa 1	BE877796
201645_at	Tenascin C (hexabrachion)	NM_002160.1
210239_at	proteína homeobox iroquois 5	U90304.1
203903_s_at	hephaestin	NM_014799.1
205816_at	integrina beta 8	NM_002214.1
203069_at	vesículas sinápticas glicoproteína 2	N_014849.1
213909_at	<i>Homo sapiens</i> cDNA FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744	AU147799
206315_at	citoquina similar al receptor del factor 1	NM_004750.1
204401_at	potasio intermedia pequeña conductancia / canal de calcio activado, subfamilia N, miembro 4	NM_002250.1
216331_at	integrina, alfa 7	AK022548.1
209663_s_at	integrina, alfa 7	AF072132.1
213125_at	DKFZP586L151 proteína	AW007573
202133_at	co-activador transcripcional con motivo de unión PDZ- (TAZ)	AA081084

(continúa)

Genes ingrementados en células umbilicus-derivadas y placenta-derivadas		
Set de Prueba ID	Nombre del gen	NCBI N° de Acceso
206511_s_at	Sine homeobox oculis homólogo 2 (Drosophila)	NM_016932.1
213435_at	KIAA1034 proteína	AB028957.1
206115_at	respuesta de crecimiento temprano 3	NM_004430.1
213707_s_at	distal de menos homeobox 5	N_005221.3
218181_s_at	FLJ20373 proteína hipotética	NM_017792.1
209160_at	aldo-ceto reductasa familia 1, C3 miembro de (3-alfa hidroxiesteroide deshidrogenasa, tipo II)	AB018580.1
213905_x_at	Biglycan	AA845258
201261_x_at	Biglycan	BC002416.1
202132_at	co-activador transcripcional con motivo de unión PDZ-(TAZ)	AA081084
214701_s_at	fibronectina 1	AJ276395.1
213791_at	proencefalina	NM_006211.1
205422_s_at	Integrina beta tipo 1 (con repetir dominios similares al EGF)	NM_004791.1
214927_at	ARNm de Homo sapiens ADNc de longitud completa inserto del clon EUROIMAGE 1968422	AL359052.1
206070_s_at	EphA3	AF213459.1
212805_at	KIAA0367 proteína	AB002365.1
219789_at	receptor del péptido natriurético C / guanilato ciclasa C (receptor de péptido C atrionatriuretic)	A1628360
219054_at	FLJ14054 proteína hipotética	NM_024563.1
213429_at	ARNm de Homo sapiens; cDNA DKFZp564B222 (desde clon DKFZp564B222)	AW025579
204929_s_at	proteína de membrana asociada a vesículas 5 (myobrevin)	NM_006634.1
201843_s_at	Contiene EGF-matriz extracelular como fibulin proteína 1	NM_004105.2
221478_at	BCL2 / adenovirus E1B 19 kDa como proteína de interacción de 3	AL132665.1
201792_at	Proteína de unión a AE 1	NM_001129.2
204570_at	citocromo c oxidasa subunidad polipeptídica VIIa 1 (músculo)	NM_001864.1
201621_at	neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1	NM_005380.1
202718_at	Proteína de unión del factor de crecimiento similar a la insulina 2, 36 kDa	NM_000597.1

Las Tablas 10-6, 10-7 y 10-8 muestran la expresión de genes aumentada en fibroblastos humanos (Tabla 10-6), células ICBM (Tabla 10-7) y MSC (Tabla 10-8).

Tabla 10-6. Genes que aumentaron en la expresión en fibroblastos en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

Genes aumentados en fibroblastos	
	fosfatasa de especificidad dual 2
	KIAA0527 proteína
	Homo sapiens cDNA: FLJ23224 fis, clon ADSU02206
	dineína, citoplasmática, polipéptido intermedio 1
	ankyrin 3, nodo de Ranvier (ankyrin G)
	inhibina, beta A (activina A, activina AB polipéptido alfa)
	pirofosfatasa ectonucleotida / fosfodiesterasa 4 (supuesta función)
	KIAA1053 proteína
	proteína asociada a microtúbulos 1A
	proteína de dedo de cinc 41
	HSPC019 proteína
	Homo sapiens cDNA: FLJ23564 fis, clon LNG 10773
	ARNm de Homo sapiens; ADNc DKFZp564A072 (del clon DKFZp564A072)
	Proteína LIM (similar al enigma proteína quinasa C de rata vinculante)
	inhibidor de la ligera kappa polipéptido potenciador del gen en las células B, la proteína-quinasa asociada complejo
	FLJ22004 proteína hipotética
	Humana (clon CTG-A4) secuencia de ARNm
	Tecnologías ecológicamente racionales, moderadamente similares a citoquina factor de tipo receptor 2; precursor CrL2 receptores de citoquinas [Homo sapiens]
	factor de crecimiento transformante beta 2
	MGC29643 proteína hipotética
	antígeno identificado mediante el anticuerpo monoclonal MRC OX-2

Tabla 10-7. Genes que aumentaron en la expresión en las células derivadas de ICBM en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

Genes aumentados en las células ICBM	
	proteínas ankyrin repetir cardiaca
	MHC de clase 1 región ORF
	integrina, alfa 10
	FLJ22362 proteína hipotética
	UDP-N-acetil-alfa-D-galactosamina: polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 3 (GalNAc-T3)
	proteína inducida por interferón-44
	SRY (región determinante del sexo Y) -box 9 (displasia campomelic, autosómica reversión sexual)
	queratina proteína asociada 1-1
	hippocalcin-like 1
	dentada 1 (síndrome de Alagille)
	proteoglicano 1, gránulo secretor

Tabla 10-8. Genes que aumentaron en la expresión en las células MSC en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

5	Genes aumentados en las células MSC
	interleukina 26
	maltasa-glucoamilasa (alfa-glucosidasa)
	subfamilia de receptores nucleares 4, grupo A, miembro 2
10	v-fos FBJ osteosarcoma murino viral oncogén homólogo
	proteína hipotética DC42
	subfamilia de receptores nucleares 4, grupo A, miembro 2
	FBJ osteosarcoma murino oncogén viral homólogo B
	WNT1 proteína vía de señalización inducible 1
15	Línea celular MCF.2 secuencia transformante derivada
	canal de potasio, subfamilia K, miembro 15
	cartílago de clase emparejado homeoprotein 1
	Homo sapiens cDNA FLJ12232 fis, MAMMA1001206 clon
	Homo sapiens cDNA FLJ34668 fis, LIVER2000775 clon
20	junio B proto-oncogén
	CLL de células B / linfoma 6 (proteína de dedo de cinc 51)
	dedo de zinc de proteínas 36, tipo C3H, homólogo (ratón)

El presente ejemplo se realizó para proporcionar una caracterización molecular de las células derivadas del cordón umbilical y placenta. Este análisis incluye células derivadas de tres cordones umbilicales diferentes y tres placentas diferentes. El estudio también incluyó dos líneas diferentes de fibroblastos dérmicos, tres líneas de citoblastos mesenquimatosos y tres líneas de células de médula ósea de la cresta ilíaca. El ARNm que se expresó por estas células se analizó sobre una matriz de oligonucleótidos GENECHIP que contuvo sondas de oligonucleótidos para 22.000 genes.

El análisis reveló que los transcritos para los 290 genes estaban presentes en diferentes cantidades en estos cinco tipos diferentes de células. Estos genes incluyen siete genes específicamente elevados en las células derivadas de tejido umbilical y diez genes que aumentaron específicamente en las células derivadas de la placenta. Se encontró que cincuenta y cuatro genes tenían niveles de expresión específicamente menores en células derivadas de la placenta y derivadas del cordón umbilical.

La expresión de genes seleccionados se ha confirmado por PCR, como se muestra en el Ejemplo 10. Las células derivadas del postparto generalmente, y células derivadas del umbilical, en particular, tienen distintos perfiles de expresión génica, por ejemplo, en comparación con otras células humanas, tales como las células derivadas de médula ósea y fibroblastos aquí probadas.

EJEMPLO 11

Marcadores celulares

Se compararon perfiles de expresión génica de células derivadas del cordón umbilical con aquellos de células derivadas de otras fuentes usando un GENECHIP de Affymetrix. Se identificaron seis genes "distintivos": receptor 1 de LDL oxidado, interleucina-8 (IL-8), renina, reticulón, ligando 3 de receptores de quimiocinas (ligando 3 de CXC) y proteína 2 quimiotáctica de granulocitos (GCP-2). Estos "genes "distintivos" se expresaron a niveles relativamente altos en células derivadas del umbilical.

Los procedimientos descritos en este ejemplo se realizaron para verificar los datos de micromatrices y comparar datos para la expresión de genes y de proteínas, además de para establecer una serie de ensayos fidedignos para la detección de identificadores únicos para células derivadas de tejido del cordón umbilical.

Se cultivaron células derivadas del umbilical (cuatro cultivos aislados) y fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF; neonatales y adultos) en medio de crecimiento en matraces T75 recubiertos con gelatina. Los citoblastos mesenquimatosos (MSC) se cultivaron en Bullet Kit de medio de crecimiento de citoblasto mesenquimatoso (MSCGM; Cambrex, Walkerville, Md.).

Para experimentos de IL-8, las células se descongelaron de nitrógeno líquido y se sembraron en matraces recubiertos con gelatina a 5.000 células/cm², se cultivaron durante 48 horas en medio de crecimiento y luego se cultivaron adicionalmente durante 8 horas en 10 mililitros de medio de privación de suero [DMEM-baja glucosa (Gibco, Carlsbad, Ca.), penicilina (50 unidades/mililitro), estreptomycin (50 microgramos/mililitro) (Gibco) y 0,1 % (peso/volumen) de albúmina de suero bovino (BSA; Sigma, St. Louis, Mo.)]. Entonces, el ARN se extrajo y los sobrenadantes se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos para eliminar el residuo celular. Los sobrenadantes se

congelaron a -80 °C hasta el análisis de ELISA.

Células derivadas del cordón umbilical, además de fibroblastos humanos derivados de prepucio neonatal humano, se cultivaron en medio de crecimiento en matraces T75 recubiertos con gelatina. Las células se congelaron en el
 5 pase 11 en nitrógeno líquido. Las células se descongelaron y se transfirieron a tubos de centrifuga de 15 mililitros. Después de la centrifugación a 150 x g durante 5 minutos, el sobrenadante se desechó. Las células se resuspendieron en 4 mililitros de medio de cultivo y se contaron. Las células se cultivaron en una matraz de 75 cm² que contenía 15 mililitros de medio de crecimiento a 375.000 célula/matraz durante 24 horas. El medio se cambió a un medio de privación de suero durante 8 horas. El medio de privación de suero se recogió al final de la incubación,
 10 se centrifugó a 14.000 x g durante 5 minutos (y se guardó a -20 °C).

Para estimar el número de células en cada matraz, 2 mililitros de tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, Ca.) se añadieron a cada matraz. Después de desprenderse las células del matraz, la actividad de la tripsina se neutralizó con 8
 15 mililitros de medio de crecimiento. Las células se transfirieron a un tubo de centrifuga de 15 mililitros y se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se eliminó y se añadió 1 mililitro de medio de crecimiento a cada tubo para resuspender las células. El número de células se determinó con un hemocitómetro.

La cantidad de IL-8 secretada por las células en medio de privación de suero se analizó usando ensayos de ELISA (R&D Systems, Mineápolis, Mn.). Todos los ensayos se realizaron según las instrucciones proporcionadas por el
 20 fabricante.

Se extrajo ARN de células derivadas del cordón umbilical confluentes y fibroblastos, o para la expresión de IL-8, de células tratadas como se ha descrito anteriormente. Las células se lisaron con 350 microlitros de tampón RLT que contenía beta-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, Mo.) según las instrucciones del fabricante (kit RNeasy Mini; Qiagen, Valencia, Ca.). Se extrajo ARN según las instrucciones del fabricante (kit RNeasy Mini; Qiagen, Valencia, Ca.) y se sometió a tratamiento con DNasa (2,7 unidades/muestra) (Sigma St. Louis, Mo.). El ARN se eluyó con 50
 25 microlitros de agua tratada con DEPC y se guardó a -80 °C. El ARN también se extrajo de cordón umbilical humano. Se suspendió tejido (30 miligramos) en 700 microlitros de tampón RLT que contenía beta-mercaptoetanol. Las muestras se homogeneizaron mecánicamente y la extracción de ARN continuó según la especificación del fabricante. Se extrajo ARN con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se guardó a -80 °C.
 30

El ARN se transcribió de forma inversa usando hexámeros aleatorios con los reactivos de transcripción inversa TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, Ca.) a 25 °C durante 10 minutos, 37 °C durante 60 minutos y 95 °C durante 10 minutos. Las muestras se almacenaron a -20 °C.
 35

Los genes identificados por micromatriz de ADNc como únicamente regulados en células de cordón umbilical (genes distintivos - que incluyen receptor de LDL oxidado, interleucina-8, renina y reticulón) se investigaron adicionalmente usando PCR en tiempo real y convencional.

La PCR se realizó sobre muestras de ADNc usando productos de expresión génica comercializados bajo el nombre comercial productos expresión génica Assays-On-Demand (Applied Biosystems). Se mezclaron el receptor de LDL oxidado (Hs00234028); renina (Hs00166915); reticulón (Hs00382515); ligando 3 de CXC (Hs00171061); GCP-2 (Hs00605742); IL-8 (Hs00174103); y GAPDH con ADNc y mezcla maestra de PCR TaqMan Universal según las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems) usando un sistema de detección de secuencias 7000 con el
 40 software ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems). Las condiciones del ciclo térmico fueron inicialmente 50 °C durante 2 minutos y 95 °C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto. Los datos de PCR se analizaron según las especificaciones del fabricante (Boletín del usuario n° 2 de Applied Biosystems para el sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700).
 45

Se realizó PCR convencional usando un ABI PRISM 7700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Boston, Ma.) para confirmar los resultados de PCR en tiempo real. La PCR se realizó usando 2 microlitros de disolución de ADNc, 1 x Taq polimerasa (nombre comercial AMPLITAQ GOLD), tampón de reacción Universal Mix PCR (Applied Biosystems) y desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos. La amplificación se optimizó para cada conjunto de cebadores. Para IL-8, el ligando 3 de CXC y reticulón (94 °C durante 15 segundos, 55 °C durante 15 segundos y 72 °C durante
 50 30 segundos durante 30 ciclos); para renina (94 °C durante 15 segundos, 53 °C durante 15 segundos y 72 °C durante 30 segundos durante 38 ciclos); para receptor de LDL oxidado y GAPDH (94 °C durante 15 segundos, 55 °C durante 15 segundos y 72 °C durante 30 segundos durante 33 ciclos). Los cebadores usados para la amplificación se enumeran en la Tabla 11-1. La concentración de cebador en la reacción de PCR final fue 1 micromolar, excepto para GAPDH que fue 0,5 micromolar. Los cebadores de GAPDH fueron los mismos que para PCR en tiempo real,
 55 excepto que la sonda TaqMan del fabricante no se añadió a la reacción de PCR final. Las muestras se separaron sobre 2 % (peso/volumen) de gel de agarosa y se tiñeron con bromuro de etidio (Sigma, St. Louis, Mo.). Se capturaron imágenes en una película 667 (Universal Twinpack, VWR International, South Plainfield, N.J.) usando una cámara POLAROID de longitud focal fija (VWR International, South Plainfield, N.J.).
 60

65

Tabla 11-1: Cebadores usados

	a.	Nombre de cebadores	cebadores
5	Receptor LDL oxilizado	S: 5'-GAGAAATCCAAAGAGCAAATGG-3' (SEQ ID NO:1)	
		A: 5'-AGAATGGAAACTGGAATAGG-3' (SEQ ID NO:2)	
	Renin	S: 5'-TCTTCGATGCTTCGGATTCC-3' (SEQ ID NO:3)	
10		A: 5'-GAATTCTCGGAATCTCTGTTG-3' (SEQ ID NO:4)	
	Reticulon	S: 5'-TTACAAGCAGTGCAGAAAACC-3' (SEQ ID NO:5)	
		A: 5'-AGTAAACATTGAAACCACAGCC-3' (SEQ ID NO:6)	
15	Interleukin-8	S: 5'-TCTGCAGCTCTGTGTGAAGG-3' (SEQ ID NO:7)	
		A: 5'-CTTCAAAAACCTTCTCCACAACC-3' (SEQ ID NO:8)	
	Chemokine (CXC) ligand 3	S: 5'-CCCACGCCACGCTCTCC-3' (SEQ ID NO:9)	
20		A: 5'-TCCTGTCAGTTGGTGCTCC-3' (SEQ ID NO:10)	

25 Células derivadas del cordón umbilical se fijaron con 4 % (peso/volumen) de paraformaldehído frío (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo.) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se usaron un cultivo aislado de cada una de las células derivadas del cordón umbilical en el pase 0 (P0) (directamente después del aislamiento) y pase 11 (P11) (dos cultivos aislados de células derivadas del cordón umbilical) y fibroblastos (P11). Se realizó inmunocitoquímica usando anticuerpos dirigidos contra los siguientes epítopes: vimentina (1:500; Sigma, St. Louis, Mo.), desmina (1:150; Sigma – producida contra conejo; o 1:300; Chemicon, Temecula, Ca. - producida contra ratón), alfa-actina de músculo liso (SMA; 1:400; Sigma), citoqueratina 18 (CK18; 1:400; Sigma), factor de von Willebrand (vWF; 1:200; Sigma) y CD34 (CD34 humano clase III; 1:100; DAKOCytomation, Carpinteria, Ca.). Además, los siguientes marcadores se probaron en las células derivadas del cordón umbilical del pase 11: anti-GROalfa humana - PE (1:100; Becton Dickinson, Franklin Lakes, N.J.), anti-GCP-2 humana (1:100; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, Ca.), anti-receptor 1 de LDL oxidado humano (ox-LDL R1; 1:100; Santa Cruz Biotech) y anti-NOGA-A humana (1:100; Santa Cruz, Biotech).

35 Los cultivos se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a un disolución de bloqueo de proteínas que contenía PBS, 4 % (v/v) de suero de cabra (Chemicon, Temecula, Ca.) y 0,3 % (v/v) de Triton (Triton X-100; Sigma, St. Louis, Mo.) durante 30 minutos para acceder a los antígenos intracelulares. Si el epítipo de interés se localizó sobre la superficie celular (CD34, ox-LDL R1), se omitió Triton X-100 en todas las etapas del procedimiento con el fin de prevenir la pérdida de epítipo. Además, en casos en los que el anticuerpo primario se produjo contra cabra (GCP-2, ox-LDL R1, NOGO-A), se usó 3 % (v/v) de suero de burro en lugar de suero de cabra en todo el procedimiento. Entonces, los anticuerpos primarios, diluidos en disolución de bloqueo, se aplicaron a los cultivos durante un periodo de 1 hora a temperatura ambiente. Se eliminaron las disoluciones de anticuerpo primario y los cultivos se lavaron con PBS antes de la aplicación de disoluciones de anticuerpo secundario (1 hora a temperatura ambiente) que contenían bloque junto con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón - Texas Red (1:250; Molecular Probes, Eugene, Or.) y/o anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo - Alexa 488 (1:250; Molecular Probes) o anticuerpo de burro anti-IgG de cabra - FITC (1:150, Santa Cruz Biotech). Entonces, los cultivos se lavaron y se aplicó DAPI 10 micromolar (Molecular Probes) durante 10 minutos para visualizar los núcleos de las células.

50 Tras la inmunotinción, la fluorescencia se visualizó usando un filtro de fluorescencia apropiado sobre un microscopio epifluorescente invertido Olympus (Olympus, Melville, N.Y.). En todos los casos, la tinción positiva representó la señal de fluorescencia por encima de la tinción de control en la que se siguió el procedimiento entero expuesto resumidamente anteriormente, con la excepción de la aplicación de una disolución de anticuerpo primario (no control 1°). Se capturaron imágenes representativas usando una videocámara en color digital y el software ImagePro (Media Cybernetics, Carlsbad, Ca.). Para muestras triplemente teñidas, cada imagen se tomó usando solo un filtro de emisión cada vez. Entonces se prepararon montajes en capas usando el software Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, Ca.).

60 Células adherentes en matraces se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco, Carlsbad, Ca.) y se desprendieron con tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, Ca.). Las células se recogieron, se centrifugaron y se resuspendieron en 3 % (v/v) de SBF en PBS a una concentración de células de 1×10^7 /mililitro. Se distribuyeron alícuotas de cien microlitros a tubos cónicos. Las células teñidas para antígenos intracelulares se permeabilizaron con Perm/tampón de lavado (BD Pharmingen, San Diego, Ca.). Se añadió anticuerpo a alícuotas según las especificaciones del fabricante, y las células se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos a 4 °C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar el exceso de anticuerpo. Las células que requieren un anticuerpo secundario se resuspendieron en 100 microlitros de 3 % de SBF. El anticuerpo secundario se añadió según la especificación del fabricante, y las células se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos a 4

°C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar el exceso de anticuerpo secundario. Las células lavadas se resuspendieron en 0,5 mililitros de PBS y se analizaron por citometría de flujo. Se usaron los siguientes anticuerpos: receptor 1 de LDL oxidado (sc-5813; Santa Cruz, Biotech), GROa (555042; BD Pharmingen, Bedford, Ma.), IgG1 kappa de ratón, (P-4685 y M-5284; Sigma) e IgG de burro contra cabra (sc-3743; Santa Cruz, Biotech.). El análisis de citometría de flujo se realizó con FACScalibur (Becton Dickinson San Jose, Ca.).

Los resultados de PCR en tiempo real para los genes "distintivos" seleccionados realizados sobre ADNc de células derivadas del cordón umbilical humano, fibroblastos adultos y neonatales, y citoblastos mesenquimatosos (MSC) indican que tanto la expresión de reticulón como del receptor de LDL oxidado fueron mayores en células derivadas del umbilical en comparación con otras células. Los datos obtenidos de PCR en tiempo real se analizaron por el procedimiento $\Delta\Delta CT$ y se expresaron en una escala logarítmica. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de ligando 3 de CXC y GCP-2 entre células postparto y controles. Los resultados de PCR en tiempo real se confirmaron por PCR convencional. La secuenciación de productos de PCR validó adicionalmente estas observaciones. No se encontró diferencia significativa en el nivel de expresión del ligando 3 de CXC entre células postparto y controles usando los cebadores de ligando 3 de CXC de PCR convencional enumerados en la Tabla 11-1.

La expresión de la citocina IL-8 en células derivadas del cordón umbilical se elevó en tanto células derivadas del cordón umbilical cultivadas en medio de crecimiento como privadas de suero. Todos los datos de PCR en tiempo real se validaron con PCR convencional y por secuenciación de productos de PCR.

Después del crecimiento en medio sin suero, los medios acondicionados se examinaron para la presencia de IL-8. Las mayores cantidades de IL-8 se detectaron en medios en los que se habían cultivado las células umbilicales (Tabla 11-2). No se detectó IL-8 en medio en el que se habían cultivado fibroblastos dérmicos humanos.

Tabla 11-2: Expresión de proteínas IL-8 como se mide por ELISA

Célula tipo	IL-8
fibroblastos humanos	ND
Placenta Aislado1	ND
UMBC Aislado 1	2058.42+-144.67
Placenta Aislado 2	ND
UMBC Aislado 2	2368.86+-22.73
Placenta Aislado 3 (normal O ₂)	17.27+-8.63
Placenta Aislado 3 (lowO ₂ , W/O BME)	264.92+-9.88
Los resultados del ensayo ELISA para la interleuquina-8 (IL-8) realizaron en células de cordón umbilical derivado de la placenta y así como fibroblastos de piel humana. Los valores se presentan aquí son células picogramos / millón, n = 2, sem. ND: No detectado	

Se sondaron células derivadas del cordón umbilical humano en el pase 0 para la producción de proteínas seleccionadas por análisis inmunocitoquímico. Inmediatamente después del aislamiento (pase 0), las células se fijaron con 4 % de paraformaldehído y se expusieron a anticuerpos para seis proteínas: factor de von Willebrand, CD34, citoqueratina 18, desmina, alfa-actina de músculo liso y vimentina. Las células derivadas del cordón umbilical fueron positivas para alfa-actina de músculo liso y vimentina, con el patrón de tinción coherente hasta el pase 11.

La producción de GROalfa, GCP-2, receptor 1 de LDL oxidado y reticulón (NOGO-A) en células derivadas del cordón umbilical en el pase 11 se investigó por inmunocitoquímica. Las células derivadas del cordón umbilical fueron positivas para GCP-2, pero por este procedimiento no se detectó la producción de GRO alfa. Además, las células fueron positivas para NOGO-A.

Se ha establecido conformidad entre los niveles de expresión génica medidos por micromatriz y PCR (tanto en tiempo real como convencional) para cuatro genes: receptor 1 de LDL oxidado, renina, reticulón y IL-8. La expresión de estos genes se reguló diferencialmente al nivel de ARNm en células derivadas del cordón umbilical, con IL-8 también diferencialmente regulado al nivel de proteína. La expresión diferencial de GCP-2 y ligando 3 de CXC no se confirmó al nivel de ARNm. Aunque este resultado no soporta datos originalmente obtenidos de los experimentos de micromatrices, esto puede ser debido a una diferencia en la sensibilidad de las metodologías.

Se sondaron células derivadas del cordón umbilical humano en el pase 0 para la expresión de alfa-actina de músculo liso y vimentina, y fueron positivas para ambas. El patrón de tinción se preservó hasta el pase 11.

En conclusión, los datos de ARNm completos verifican al menos parcialmente los datos obtenidos de los experimentos en micromatriz.

EJEMPLO 12**Caracterización inmunohistoquímica de fenotipos celulares**

5 Se analizaron los fenotipos de células encontradas dentro del cordón umbilical humano por inmunohistoquímica.

Se recogió tejido del cordón umbilical humano y se fijó por inmersión en 4 % (peso/volumen) de paraformaldehído durante la noche a 4 °C. Se realizó inmunohistoquímica usando anticuerpos dirigidos contra los siguientes epítopes (véase la Tabla 12-1): vimentina (1:500; Sigma, St. Louis, Mo.), desmina (1:150, producida contra conejo; Sigma; o 10 1:300, producida contra ratón; Chemicon, Temecula, Ca.), alfa-actina de músculo liso (SMA; 1:400; Sigma), citoqueratina 18 (CK18; 1:400; Sigma), factor de von Willebrand (vWF; 1:200; Sigma) y CD34 (CD34 humano clase III; 1:100; DAKOCytomation, Carpinteria, Ca.). Además, se probaron los siguientes marcadores: anti-GROalfa humana-PE (1:100; Becton Dickinson, Franklin Lakes, N.J.), anti-GCP-2 humana (1:100; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, Ca.), anti-receptor 1 de LDL oxidado humano (ox-LDL R1; 1:100; Santa Cruz Biotech) y anti-NOGO-A humana 15 (1:100; Santa Cruz Biotech). Los especímenes fijados se recortaron con un bisturí y se pusieron dentro de compuesto de incorporación OCT (Tissue-Tek OCT; Sakura, Torrance, Ca.) sobre un baño de hielo seco que contenía etanol. Entonces, los bloques congelados se seccionaron (10 micrómetros de espesor) usando un criostato estándar (Leica Microsystems) y se montaron sobre portaobjetos de vidrio para la tinción.

20 Se realizó inmunohistoquímica similarmente a los estudios previos (por ejemplo, Messina y col., Exper. Neurol., 2003; 184: 816-829). Se lavaron secciones de tejido con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una disolución de bloqueo de proteínas que contenía PBS, 4 % (v/v) de suero de cabra (Chemicon, Temecula, Ca.) y 0,3 % (v/v) de Triton (Triton X-100; Sigma) durante 1 hora para acceder a los antígenos intracelulares. En los casos en los que el epítipo de interés estuviera localizado sobre la superficie celular (CD34, 25 ox-LDL R1), se omitió Triton en todas las etapas del procedimiento con el fin de prevenir la pérdida de epítipo. Además, en casos en los que el anticuerpo primario se produjo contra cabra (GCP-2, ox-LDL R1, NOGO-A), se usó 3 % (v/v) de suero de burro en lugar de suero de cabra en todo el procedimiento. Entonces, los anticuerpos primarios, diluidos en disolución de bloqueo, se aplicaron a las secciones durante un periodo de 4 horas a temperatura ambiente. Se eliminaron las disoluciones de anticuerpo primario y los cultivos se lavaron con PBS antes 30 de la aplicación de disoluciones de anticuerpo secundario (1 hora a temperatura ambiente) que contenían bloque junto con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón - Texas Red (1:250; Molecular Probes, Eugene, Or.) y/o anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo - Alexa 488 (1:250; Molecular Probes) o anticuerpo de burro anti-IgG de cabra - FITC (1:150, Santa Cruz Biotech). Entonces, los cultivos se lavaron y se aplicó DAPI 10 micromolar (Molecular Probes) durante 10 minutos para visualizar los núcleos de las células.

35 Tras la inmunotinción, la fluorescencia se visualizó usando el filtro de fluorescencia apropiado sobre un microscopio epifluorescente invertido Olympus (Olympus, Melville, N.Y.). La tinción positiva se representó por la señal de fluorescencia por encima de la tinción de control. Se capturaron imágenes representativas usando una videocámara en color digital y el software ImagePro (Media Cybernetics, Carlsbad, Ca.). Para muestras triplemente teñidas, cada 40 imagen se tomó usando solo un filtro de emisión cada vez. Entonces se prepararon montajes en capas usando el software Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, Ca.).

Tabla 12-1: Resumen de anticuerpos primarios usados

45	Anticuerpo	Concentración	Vendor
	Vimentina	1:500	Sigma, St. Louis, MO
	Desmina (rb)	1:150	Sigma
	Desmina (m)	1:300	Chemicon, Temecula, CA
50	alfa-actina de músculo liso (SMA)	1:400	Sigma
	Citokeratina 18 (CK18)	1:400	Sigma
	von Willebrand factor (vWF)	1:200	Sigma
	CD34 III	1:100	DakoCytomation, Carpinteria, CA
	GROalpha-PE	1:100	BD, Franklin Lakes, NJ
55	GCP-2	1:100	Santa Cruz Biotech
	Ox-LDL R1	1:100	Santa Cruz Biotech
	NOGO-A	1:100	Santa Cruz Biotech

60 Los marcadores vimentina, desmina, SMA, CK18, vWF y CD34 se expresaron en un subconjunto de las células encontradas dentro de cordón umbilical (datos no mostrados). En particular, la expresión de vWF y CD34 se limitó a los vasos sanguíneos contenidos dentro del cordón. Las células CD34+ estuvieron en la capa más interna (lado de la luz). La expresión de vimentina se encontró a lo largo de la matriz y vasos sanguíneos del cordón. La SMA se limitó a la matriz y las paredes externas de la arteria y vena, pero no estuvo contenida dentro de los propios vasos. Se observaron CK18 y desmina dentro de los vasos solo, estando la desmina limitada a las capas central y externa.

65 Ninguno de estos marcadores se observó dentro del cordón umbilical (datos no mostrados).

La vimentina, desmina, alfa-actina de músculo liso, citoqueratina 18, factor de von Willebrand y CD34 se expresan en células dentro del cordón umbilical humano. Basándose en los estudios de caracterización *in vitro* que muestran que solo la vimentina y la alfa-actina de músculo liso se expresan, los datos sugieren que el actual procedimiento de aislamiento de células derivadas del cordón umbilical recoge una subpoblación de células o que las células aisladas cambian la expresión de marcadores para expresar vimentina y alfa-actina de músculo liso.

EJEMPLO 13

Secreción de factores tróficos por células

Se midió la secreción de factores tróficos seleccionados de células derivadas del umbilical. Se seleccionaron factores que tienen actividad angiogénica tales como factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (Rosen y col., Ciba Found. Symp., 1997; 212:215-26), proteína 1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1) (Salcedo y col., Blood, 2000; 96:34-40), interleucina-8 (IL-8) (Li y col., J. Immunol., 2003; 170:3369-76), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Hughes y col., Ann. Thorac. Surg., 2004; 77:812-8), inhibidor tisular de metaloproteínasa de la matriz 1 (TIMP1), angiopoyetina 2 (ANG2), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFbb), trombopoyetina (TPO), factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF), factor 1alfa derivado del estroma (SDF-1alfa), actividad neurotrófica/neuroprotectora (factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Cheng y col., Dev. Biol., 2003; 258:319-33), interleucina-6 (IL-6), proteína 2 quimiotáctica de granulocitos (GCP-2), factor de crecimiento beta2 transformante (TGFbeta2)) o actividad de quimiocinas (proteína 1 alfa inflamatoria de macrófagos (MIP1alfa), proteína 1 beta inflamatoria de macrófagos (MIP1beta), quimioatrayente-1 de monocitos (MCP-1), Rantes (regulada con la activación, expresada en linfocitos T normales y secretada), 1309, quimiocina regulada por el timo y activación (TARC), eotaxina, quimiocina derivada de macrófagos (MDC) y IL-8.

Se cultivaron células derivadas del cordón umbilical, además de fibroblastos humanos derivados de prepucio neonatal humano, en medio de crecimiento en matraces T75 recubiertos con gelatina. Las células se criopreservaron en el pase 11 y se guardaron en nitrógeno líquido. Después de descongelarse, se añadió medio de crecimiento a las células, seguido de transferencia a un tubo de centrifugación de 15 mililitros y centrifugación de las células a 150 x g durante 5 minutos. El sedimento de células se resuspendió en 4 mililitros de medio de crecimiento, y las células se contaron. Las células se sembraron a 5.000 células/cm² en matraces T75 que contenían cada uno 15 mililitros de medio de crecimiento, y se cultivaron durante 24 horas. El medio se cambió a un medio sin suero (bajo en glucosa (Gibco), 0,1 % (peso/volumen) de albúmina de suero bovino (Sigma), penicilina (50 unidades/mililitro) y estreptomycin (50 microgramos/mililitro, Gibco)) durante 8 horas. El medio acondicionado sin suero se recogió al final de la incubación por centrifugación a 14.000 x g durante 5 minutos y se guardó a -20 °C.

Para estimar el número de células en cada matraz, las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se desprendieron usando 2 mililitros de tripsina/EDTA (Gibco). La actividad de la tripsina se inhibió mediante la adición de 8 mililitros de medio de crecimiento. Las células se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se eliminó, y las células se resuspendieron en 1 mililitro de medio de crecimiento. El número de células se estimó con un hemocitómetro.

Las células se cultivaron a 37 °C en 5 % de dióxido de carbono y oxígeno atmosférico. La cantidad de MCP-1, IL-6, VEGF, SDF-1alfa, GCP-2, IL-8 y TGF-beta2 producida por cada muestra de células se determinó por ELISA (R&D Systems, Mineápolis, Mn.). Todos los ensayos se realizaron según las instrucciones del fabricante. Los valores presentados son picogramos por mililitro por millón de células (n=2, sem).

Las quimiocinas (MIP1alfa, MIP1beta, MCP-1, Rantes, 1309, TARC, eotaxina, MDC, IL8), BDNF y factores angiogénicos (HGF, KGF, bFGF, VEGF, TIMP1, ANG2, PDGFbb, TPO, HB-EGF) se midieron usando matrices SearchLight Proteome (Pierce Biotechnology Inc.). Las matrices Proteome son ELISA de sándwich multiplexados para la medición cuantitativa de dos a dieciséis proteínas por pocillo. Las matrices se producen aplicando en puntos un patrón 2 x 2, 3 x 3 ó 4 x 4 de cuatro a dieciséis anticuerpos de captura diferentes en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Tras un procedimiento de ELISA de sándwich, la placa entera se somete a obtención de imágenes para capturar la señal quimioluminiscente generada en cada punto dentro de cada pocillo de la placa. La señal generada en cada punto es proporcional a la cantidad de proteína diana en el patrón o muestra original.

Se secretaron MCP-1 y IL-6 por células derivadas del umbilical y fibroblastos dérmicos (Tabla 13-1). Se secretaron SDF-1alfa y GCP-2 por fibroblastos. Se secretaron GCP-2 y IL-8 por células derivadas del umbilical. TGF-beta2 no se detectó de ningún tipo de célula por ELISA.

Tabla 13-1. Resultados de ELISA: Detección de factores tróficos

	MCP-1	IL-6	VEGF	SDF-1 α	GCP-2	IL-8	TGF-beta2
Fibroblast	17 $\pm$ 1	61 $\pm$ 3	29 $\pm$ 2	19 $\pm$ 1	21 $\pm$ 1	ND	ND
Umbilical (022803)	1150 $\pm$ 74	4234 $\pm$ 289	ND	ND	160 $\pm$ 11	2058 $\pm$ 145	ND
Umbilical (071003)	2794 $\pm$ 84	1356 $\pm$ 43	ND	ND	2184 $\pm$ 98	2369 $\pm$ 23	ND
Clave: ND: No detectada., $\pm$ sem							

Ensayo de ELISA multiplexado SearchLight. Se secretaron TIMP1, TPO, KGF, HGF, FGF, HBEGF, BDNF, MIP1beta, MCP1, RANTES, 1309, TARC, MDC y IL-8 de PPDC derivadas del umbilical (Tablas 13-2 y 13-3). No se detectaron Ang2, VEGF o PDGFbb.

Tabla 13-2. Resultados del ensayo de ELISA multiplexado SearchLight

	TIMP1	ANG2	PDGFbb	TPO	KGF	HGF	FGF	VEGF	HBEGF	BDNF
hFB	19306.3	ND	ND	230.5	5.0	ND	ND	27.9	1.3	ND
U1	57718.4	ND	ND	1240.0	5.8	559.3	148.7	ND	9.3	165.7
U3	21850.0	ND	ND	1134.5	9.0	195.6	30.8	ND	5.4	388.6
Clave: HFB (fibroblastos humanos), U1 (derivados-ombigo PPDC (022,803)), U3 (derivados-ombigo PPDC (071003)). ND: No detectada										

Tabla 13-3. Resultados del ensayo de ELISA multiplexado SearchLight

	MIP1a	MIP1b	MCP1	RANTES	1309	TARC	Eotaxin	MDC	IL8
hFB	ND	ND	39.6	ND	ND	0.1	ND	ND	204.9
U1	ND	8.0	1694.2	ND	22.4	37.6	ND	18.9	51930.1
U3	ND	5.2	2018.7	41.5	11.6	21.4	ND	4.8	10515.9
Clave: HFB (fibroblastos humanos), (derivado-ombigo PPDC (022803)) U1, derivado del ombigo U3 (PPDC (071003)). ND: No Detectada									

Las células derivadas del umbilical secretaron varios factores tróficos. Algunos de estos factores tróficos, tales como HGF, bFGF, MCP-1 y IL-8, desempeñan funciones importantes en la angiogénesis. Otros factores tróficos, tales como BDNF y IL-6, tienen funciones importantes en la regeneración o protección neural.

EJEMPLO 14

Inmunología *in vitro*

Se evaluaron líneas celulares del cordón umbilical *in vitro* para sus características inmunológicas en un esfuerzo por predecir la respuesta inmunológica, si la hay, que estas células provocarían tras el trasplante *in vivo*. Se ensayaron líneas celulares de cordón umbilical por citometría de flujo para la expresión de HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86 y B7-H2. Estas proteínas se expresan por células presentadoras de antígeno (APC) y son requeridas para la estimulación directa de linfocitos T CD4⁺ sin tratamiento previo (Abbas & Lichtman, Cellular and Molecular Immunology, 5ª ed. (2003) Saunders, Filadelfia, pág. 171). Las líneas celulares también se analizaron por citometría de flujo para la expresión de HLA-G (Abbas & Lichtman, Cellular and Molecular Immunology, 5ª ed. (2003) Saunders, Filadelfia, pág. 171), CD178 (Coumans y col., Journal of Immunological Methods, 1999; 224, 185-196) y PD-L2 (Abbas & Lichtman, Cellular and Molecular Immunology, 5ª ed. (2003) Saunders, Filadelfia, pág. 171; Brown y col., The Journal of Immunology, 2003; 170, 1257-1266). Se cree que la expresión de estas proteínas por células que residen en los tejidos placentarios media en el estado inmunoprivilegiado de tejidos placentarios en el útero. Para predecir el grado al que las líneas celulares postparto derivadas del umbilical provocan una respuesta

inmunitaria *in vivo*, las líneas celulares se probaron en una reacción linfocitaria mixta unilateral.

Las células se cultivaron en medio de crecimiento (DMEM-baja glucosa (Gibco, Carlsbad, Ca.), 15 % (v/v) de suero bovino fetal (SBF); (Hyclone, Logan, Ut.), 0,001 % (v/v) de beta-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, Mo.), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin (Gibco, Carlsbad, Ca.) hasta confluencia en matraces T75 (Corning, Corning, N.Y.) recubiertos con 2 % de gelatina (Sigma, St. Louis, Mo.).

Las células se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco, Carlsbad, Ca.) y se desprendieron con tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, Ca.). Las células se recogieron, se centrifugaron y se resuspendieron en 3 % (v/v) de SBF en PBS a una concentración celular de 1×10^7 por mililitro. El anticuerpo (Tabla 14-1) se añadió a cien microlitros de suspensión de células según las especificaciones del fabricante y se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos a 4 °C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar el anticuerpo no unido. Las células se resuspendieron en quinientos microlitros de PBS y se analizaron por citometría de flujo usando un instrumento FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, Ca.).

Tabla 14-1. Anticuerpos

Anticuerpos	Manufacturador	Nº de Catálogo
HLA-DRDPDQ	BD Pharmingen (San Diego, Ca.)	555558
CD80	BD Pharmingen (San Diego, Ca.)	557227
CD86	BD Pharmingen (San Diego, Ca.)	555665
B7-H2	BD Pharmingen (San Diego, Ca.)	552502
HLA-G	Abcam (Cambridgeshire, UK)	ab 7904-100
CD 178	Santa Cruz (San Cruz, Ca.)	sc-19681
PD-L2	BD Pharmingen (San Diego, Ca.)	557846
Ratón IgG2a	Sigma (St. Louis, Mo.)	F-6522
Ratón IgG 1 kappa	Sigma (St. Louis, Mo.)	P-4685

Viales criopreservados de células derivadas del cordón umbilical de pase 10 marcadas como la línea celular A se empaquetaron sobre nieve carbónica y se enviaron a CTBR (Senneville, Quebec) para realizar una reacción linfocitaria mixta usando CTBR SOP nº CAC-031. Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) se recogieron de múltiples voluntarios donantes masculinos y femeninos. CMSP alógenas estimulantes (donante), CMSP autólogas y líneas de células derivadas de tejido del cordón umbilical se trataron con mitomicina C. Se añadieron células estimulantes autólogas y tratadas con mitomicina C a CMSP del paciente que responde (receptor) y se cultivaron durante 4 días. Después de la incubación, se añadió [³H]timidina a cada muestra y se cultivaron durante 18 horas. Tras recoger las células, se extrajo ADN radiomarcado y la incorporación de [³H]-timidina se midió usando un contador de centelleo.

El índice de estimulación para el donante alógeno (SIAD) se calculó como la proliferación media del receptor más donante alógeno tratado con mitomicina C dividido entre la proliferación inicial del receptor. El índice de estimulación de las células derivadas del cordón umbilical se calculó como la proliferación media del receptor más línea celular derivada de tejido del cordón umbilical tratada con mitomicina C dividido entre la proliferación inicial del receptor.

Se cribaron seis donantes de sangre voluntarios humanos para identificar un único donante alógeno que presentaría una robusta respuesta de proliferación en una reacción linfocitaria mixta con los otros cinco donantes de sangre. Este donante se seleccionó como el donante de control positivo alógeno. Los cinco donantes de sangre restantes se seleccionaron como receptores. El donante de control positivo alógeno y las líneas celulares derivadas del cordón umbilical se trataron con mitomicina C y se cultivaron en una reacción linfocitaria mixta con los cinco receptores alógenos individuales. Las reacciones se realizaron por triplicado usando dos placas de cultivo celular con tres receptores por placa (Tabla 14-2). El índice de estimulación promedio osciló de 6,5 (placa 1) a 9 (placa 2) y los controles positivos de donantes alógenos oscilaron de 42,75 (placa 1) a 70 (placa 2) (Tabla 14-3).

Tabla 14-2. Datos de la reacción linfocitaria mixta - Línea celular A (cordón umbilical)

	DPM para proliferación de ensayo									
5	Placa ID: Placa 1									
	Número analítico	Sistema cultura		Replicas				Significado	SD	CV
				1	2	3				
10	IM04-2478	Proliferación de línea de base de receptor Control de la autoestimulación (Mitomicina C tratada células autólogas) MLR donante alogénico IM04-2477 (Mitomicina C tratado) MLR con la línea celular (Mitomicina C tratada celular tipo A)		1074	406	391		623.7	390.07	62.5
15				672	510	1402		861.3	475.19	55.2
20				43777	48391	38231		43466.3	5087.12	11.7
25				2914	5622	6109		4881.7	1721.36	35.3
	SI (donante)							70		
	SI (línea celular)							8		
30	IM04-2479	Proliferación de línea de base de receptor Control de la autoestimulación (Mitomicina C tratada células autólogas) MLR donante alogénico IM04-2477 (Mitomicina C tratado) MLR con la línea celular (Mitomicina C tratada celular tipo A)		530	508	527		521.7	11.93	2.3
35				701	567	1111		793.0	283.43	35.7
40				25593	24732	22707		24344.0	1481.61	6.1
45				5086	3932	1497		3505.0	1832.21	52.3
	SI (donante)							47		
	SI (línea celular)							7		
50	IM04-2480	Proliferación de línea de base de receptor Control de la autoestimulación (Mitomicina C tratada células autólogas) MLR donante alogénico IM04-2477 (Mitomicina C tratado) MLR con la línea celular (Mitomicina C tratada celular tipo A)		1192	854	1330		1125.3	244.90	21.8
55				2963	993	2197		2051.0	993.08	48.4
60				25416	29721	23757		26298.0	3078.27	11.7
65				2596	5076	3426		3699.3	1262.39	34.1
	SI (donante)							23		
	SI (línea celular)							3		

(Continúa)

	DPM para proliferación de ensayo									
5	Placa ID: Placa 1									
	Número analítico	Sistema cultura		Replicas				Significado	SD	CV
				1	2	3				
10	IM04-2481	Proliferación de línea de base de receptor Control de la autoestimulación (Mitomicina C tratada células autólogas) MLR donante alogénico IM04-2477 (Mitomicina C tratado) MLR con la línea celular (Mitomicina C tratada celular tipo A)		695	451	555		567.0	122.44	21.6
			738	1252	464		818.0	400.04	48.9	
15			13177	24885	15444		17835.3	6209.52	34.8	
20			4495	3671	4674		4280.0	534.95	12.5	
25	SI (donante) SI (línea celular)							31 8		
30	Placa ID: Placa 2									
	Número analítico	Sistema cultura		Replicas				Significado	SD	CV
				1	2	3				
35	IM04-2482	Proliferación de línea de base de receptor Control de la autoestimulación (Mitomicina C tratada células autólogas) MLR donante alogénico IM04-2477 (Mitomicina C tratado) MLR con la línea celular (Mitomicina C tratada celular tipo A)		432	533	274		413.0	130.54	31.6
			1459	633	598		896.7	487.31	54.3	
40			24286	30823	31346		28818.3	3933.82	13.7	
45			2762	1502	6723		3662.3	2724.46	74.4	
50	SI (donante) SI (línea celular)							70 9		
55	IM04-2477 (donante alogénico)	Proliferación de línea de base de receptor Control de la autoestimulación (Mitomicina C tratada células autólogas)		312	419	349		360.0	54.34	15.1
			567	604	374		515.0	123.50	24.0	
60										
65	Línea celular tipo A	Proliferación de línea de base de receptor Control de la autoestimulación (Mitomicina C tratada células autólogas)		5101	3735	2973		3936.3	1078.19	27.4
				1924	4570	2153		2882.3	1466.04	50.9

Tabla 14-3. Índice de estimulación promedio de células derivadas del cordón umbilical y un donante alógeno en una reacción linfocitaria mixta con cinco receptores alógenos individuales.

5		Recipiente	Cordón umbilical
	Placa (Receptores 1-4)	42.75	6.5
	Placa (Receptor 5)	70	9

- 10 Los histogramas de células derivadas del cordón umbilical analizados por citometría de flujo muestran expresión negativa de HLA-DR, DP, DQ, CD80, CD86 y B7-H2, como se observa por el valor de fluorescencia de acuerdo con el control de IgG, que indica que las líneas celulares derivadas del cordón umbilical carecen de las moléculas de la superficie celular requeridas para estimular directamente CMSP alógenas (por ejemplo, linfocitos T CD4⁺).
- 15 Los histogramas de células derivadas del cordón umbilical analizados por citometría de flujo muestran expresión positiva de PD-L2, como se observa por el aumento del valor de fluorescencia con respecto al control de IgG, y expresión negativa de CD178 y HLA-G, como se observa por el valor de fluorescencia de acuerdo con el control de IgG.
- 20 En las reacciones linfocitarias mixtas realizadas con líneas celulares derivadas del cordón umbilical, el índice de estimulación promedio osciló de 6,5 a 9, y el de los controles positivos alógenos osciló de 42,75 a 70. Las líneas celulares derivadas del cordón umbilical fueron negativas para la expresión de las proteínas estimulantes HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86 y B7-H2, como se mide por citometría de flujo. Las líneas celulares derivadas del cordón umbilical fueron negativas para la expresión de proteínas inmunomoduladoras HLA-G y CD178 y positivas
- 25 para la expresión de PD-L2, como se mide por citometría de flujo. Las CMSP de donante alógeno contuvieron células presentadoras de antígeno que expresan HLA-DP, DR, DQ, CD80, CD86 y B7-H2, permitiendo así la estimulación de CMSP alógenas (por ejemplo, linfocitos T CD4⁺ sin tratamiento previo). La ausencia de moléculas superficiales de células presentadoras de antígeno sobre células derivadas del cordón umbilical requeridas para la estimulación directa de CMSP alógenas (por ejemplo, linfocitos T CD4⁺ sin tratamiento previo) y la presencia de PD-
- 30 L2, una proteína inmunomoduladora, puede explicar el bajo índice de estimulación presentado por estas células en una MLR en comparación con controles alógenos.

EJEMPLO 15

- 35 La telomerasa sirve para sintetizar repeticiones de telómeros que sirven para proteger la integridad de cromosomas y para prolongar el periodo de vida replicativo de las células (Liu, K y col., PNAS, 1999: 96:5147-5152). La telomerasa consiste en dos componentes, molde de ARN de telomerasa (hTER) y transcriptasa inversa de telomerasa (hTERT). La regulación de telomerasa se determina por transcripción de hTERT, pero no hTER. Así, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real para ARNm de hTERT es un procedimiento aceptado
- 40 para determinar la actividad de telomerasa de células.

Aislamiento de células

- 45 Se realizaron experimentos de PCR en tiempo real para determinar la producción de telomerasa de células derivadas de tejido del cordón umbilical humano. Las células derivadas de tejido del cordón umbilical humano se prepararon según los Ejemplos 4 - 14 y los ejemplos expuestos en la solicitud de EE.UU. n° de serie 10/877.012 (la solicitud '012), que se concedió como la patente de EE.UU. n° 7.510.873. Generalmente, cordones umbilicales obtenidos de National Disease Research Interchange (Filadelfia, Pa.) tras una administración normal se lavaron para eliminar la sangre y residuos y se disociaron mecánicamente. Entonces, el tejido se incubó con enzimas de digestión
- 50 que incluyen colagenasa, dispasa y hialuronidasa en medio de cultivo a 37 °C. Las células derivadas de tejido del cordón umbilical humano se cultivaron según los procedimientos expuestos en los ejemplos de la solicitud '012. Se obtuvieron citoblastos mesenquimatosos y fibroblastos de piel dérmica normal (cc-2509 lote n° 9F0844) de Cambrex, Walkersville, Md. Se compró una línea celular de carcinoma embrionario testicular humano pluripotente (teratoma) de células nTera-2 (NTERA-2 cl.D1), (véase, Plaia y col., Stem Cells, 2006; 24(3):531-546) de ATCC (Manassas, Va.) y se cultivó según los procedimientos expuestos en la solicitud '012.

Aislamiento de ARN total

- 60 Se extrajo ARN de las células usando (kit RNeasy® (Qiagen, Valencia, Ca.). Se eluyó ARN con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se guardó a -80 °C. El ARN se transcribió de forma inversa usando hexámeros aleatorios con los reactivos de transcripción inversa TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, Ca.) a 25 °C durante 10 minutos, 37 °C durante 60 minutos y 95 °C durante 10 minutos. Las muestras se almacenaron a -20 °C.

PCR en tiempo real

- 65 Se realizó PCR sobre muestras de ADNc usando los ensayos de Applied Biosystems On-Demand™ (también

conocidos como ensayos de expresión génica Tasman®) según las especificaciones del fabricante (Applied Biosystems). Este kit comercial se usa ampliamente para ensayar telomerasa en células humanas. Brevemente, se mezclaron hTERT (gen telomerasa humana) (Hs00162669) y GAPDH humano (un control interno) con ADNc y la mezcla maestra TaqMan® Universal PCR usando un sistema de detección de secuencias 7000 con el software ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems). Las condiciones de los ciclos térmicos fueron inicialmente 50 °C durante 2 min y 95 °C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 min. Se analizaron datos de PCR según las especificaciones del fabricante.

Se ensayaron células derivadas de tejido del cordón umbilical humano (nº de acceso de ATCC PTA-6067), fibroblastos y citoblastos mesenquimatosos para hTERT y 18S ARN. Como se muestra en la Tabla 15-1, no se detectaron hTERT, y por tanto, telomerasa, en células derivadas de tejido del cordón umbilical humano.

Tabla 15-1

	hTERT	18S RNA
Células umbilicales (022803)	ND	+
Fibroblasts	ND	+
ND- no detectada; + señal detectada		

Se ensayaron células derivadas de tejido del cordón umbilical humano (cultivo aislado 022803, nº de acceso de ATCC PTA-6067) y células nTera-2 y los resultados no mostraron expresión de la telomerasa en dos lotes de células derivadas de tejido del cordón umbilical humano mientras que la línea celular de teratoma reveló alto nivel de expresión (Tabla 15-2).

Tabla 15-2

Tipo de célula	hTERT		GAPDH		
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	hTERT nom.
nTera2	22.85	27.31	16.41	16.31	.61
022803	-	-	22.97	22.79	-

Por tanto, puede llegarse a la conclusión de que las células derivadas de tejido umbilical humano no expresan telomerasa.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> KRAMER, BRIAN C. HERZBERG, URI

<120> CÉLULAS Y SISTÉMICAMENTE administrada localmente PARA EL DOLOR NEUROPÁTICO

<130> 026038.0227PTWO

<140> PCTUS0968879

<141> 2009-12-19

<150> 61/139,169

<151> 2008-12-19

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 1

gagaaatcca aagagcaaat gg 22

<210> 2

<211> 21

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético
 <400> 2
 agaattggaaa actggaatag g 21
 10 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético
 <400> 3
 tcttcgatgc ttcggattcc 20
 20 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético
 <400> 4
 30 gaattctcgg aatctctgtt g 21
 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético
 40 <400> 5
 ttacaagcag tgcagaaaac c 21
 <210> 6
 <211> 22
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 50 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético
 <400> 6
 agtaaacatt gaaaccacag cc 22
 55 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético
 <400> 7
 65 tctgcagctc tgtgtgaagg 20
 <210> 8

<211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 8
 ctcaaaaac ttctccacaa cc 22

10 <210> 9
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 9
 20 cccacgccac gctctcc 17

<210> 10
 <211> 19
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

30 <400> 10
 tctgtcagt tgggtctcc 19

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

1. Una composición que comprende una población de células derivadas de tejido del cordón umbilical aisladas para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene dolor neuropático, espasticidad neural o dolor crónico, en la que dichas células se derivan de tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, capaz de auto-renovación y expansión en cultivo, son negativas para CD117 y no expresan hTERT o telomerasa, en la que el tratamiento comprende administrar la población de células derivadas de tejido del cordón umbilical aisladas sistémicamente.

2. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el tratamiento comprende administrar la población de células derivadas de tejido del cordón umbilical aisladas intravenosamente, interperitonealmente, intrarterialmente o mediante jeringas con agujas o catéteres con o sin dispositivos de bomba.

3. La composición para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la composición comprende vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables seleccionados del grupo que consiste en: solución salina, disoluciones de tampón acuosas, disolventes, composición de medio de dispersión, y una mezcla de los mismos.

4. La composición para su uso según una cualquiera de la reivindicación 1 a 3, en la que la composición comprende además uno o más hidrogeles que están seleccionados del grupo que consiste en: colágeno, atelocolágeno, fibrina, trombina-fibrina, y una mezcla de los mismos.

5. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la población de células derivadas de tejido del cordón umbilical aisladas comprende células que son genéticamente modificadas para producir productos génicos terapéuticamente útiles o para producir agentes para facilitar o soportar la formación o crecimiento de tejido neural.

6. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, comprendiendo dicha composición además una población de células derivadas de uno o más de los siguientes tejidos: tejido dérmico, tejido vascular, tejido conjuntivo, cartílago, tejido adiposo, tejido de músculo, tendones o ligamentos.

7. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que las células derivadas de tejido del cordón umbilical aisladas comprenden además las siguientes características:

el potencial de al menos aproximadamente 40 duplicaciones en cultivo;

producción de CD10, CD13, CD44, CD73 y CD90;

expresión de un gen, que con respecto a una célula humana que es un fibroblasto, un citoblasto mesenquimatoso o una célula de médula ósea de la cresta ilíaca, es elevada para un gen que codifica interleucina 8 y reticulón 1; y

carece de producción de CD45.

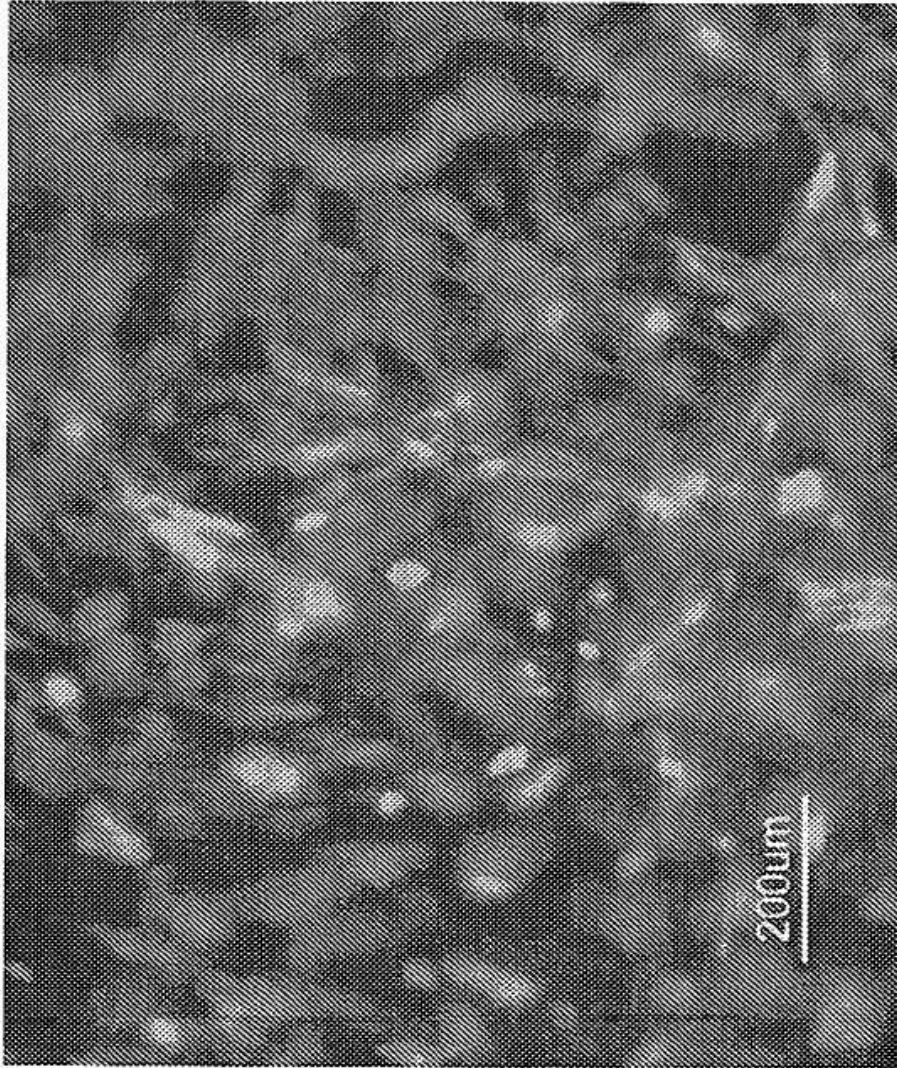


Figura 1

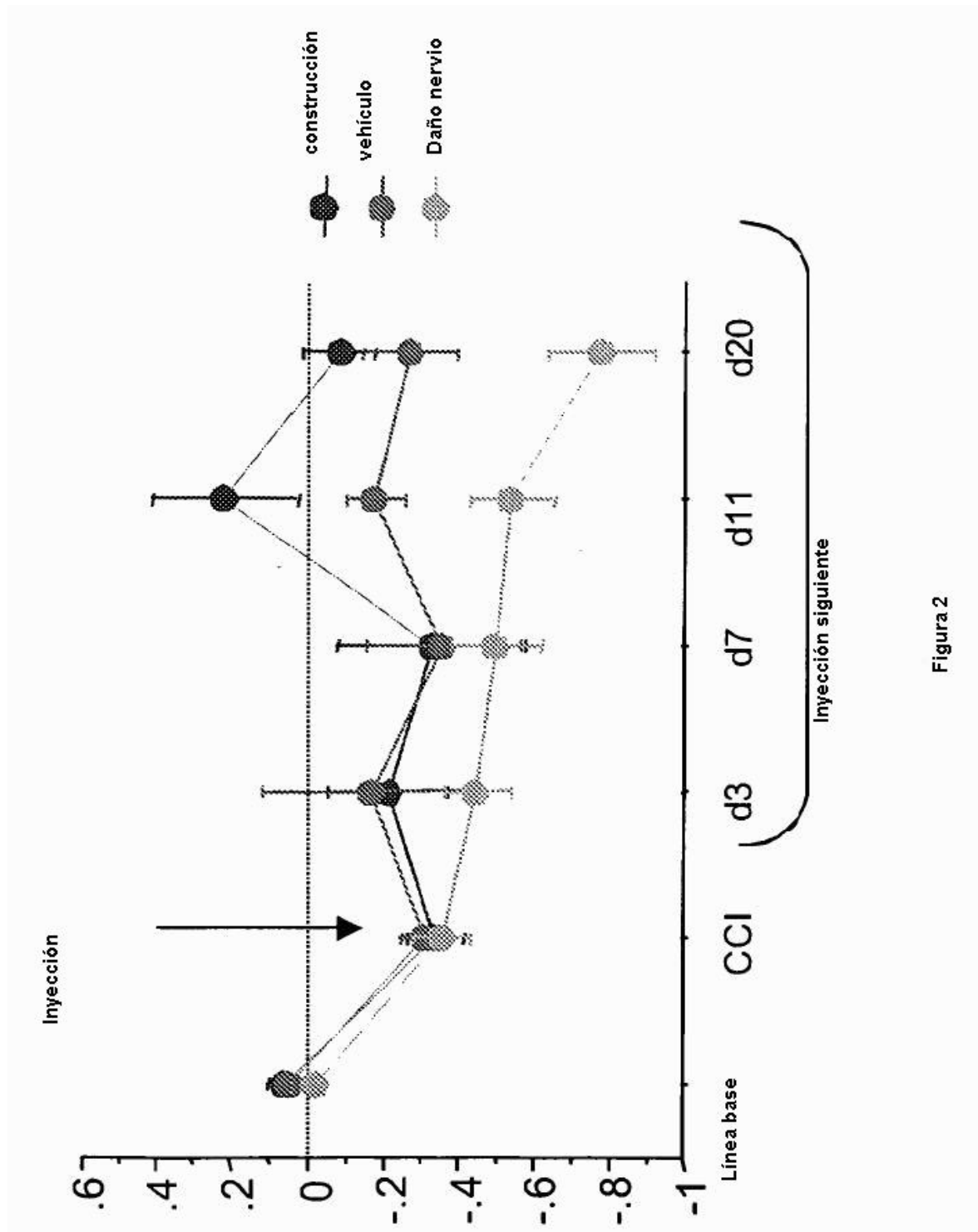


Figura 2

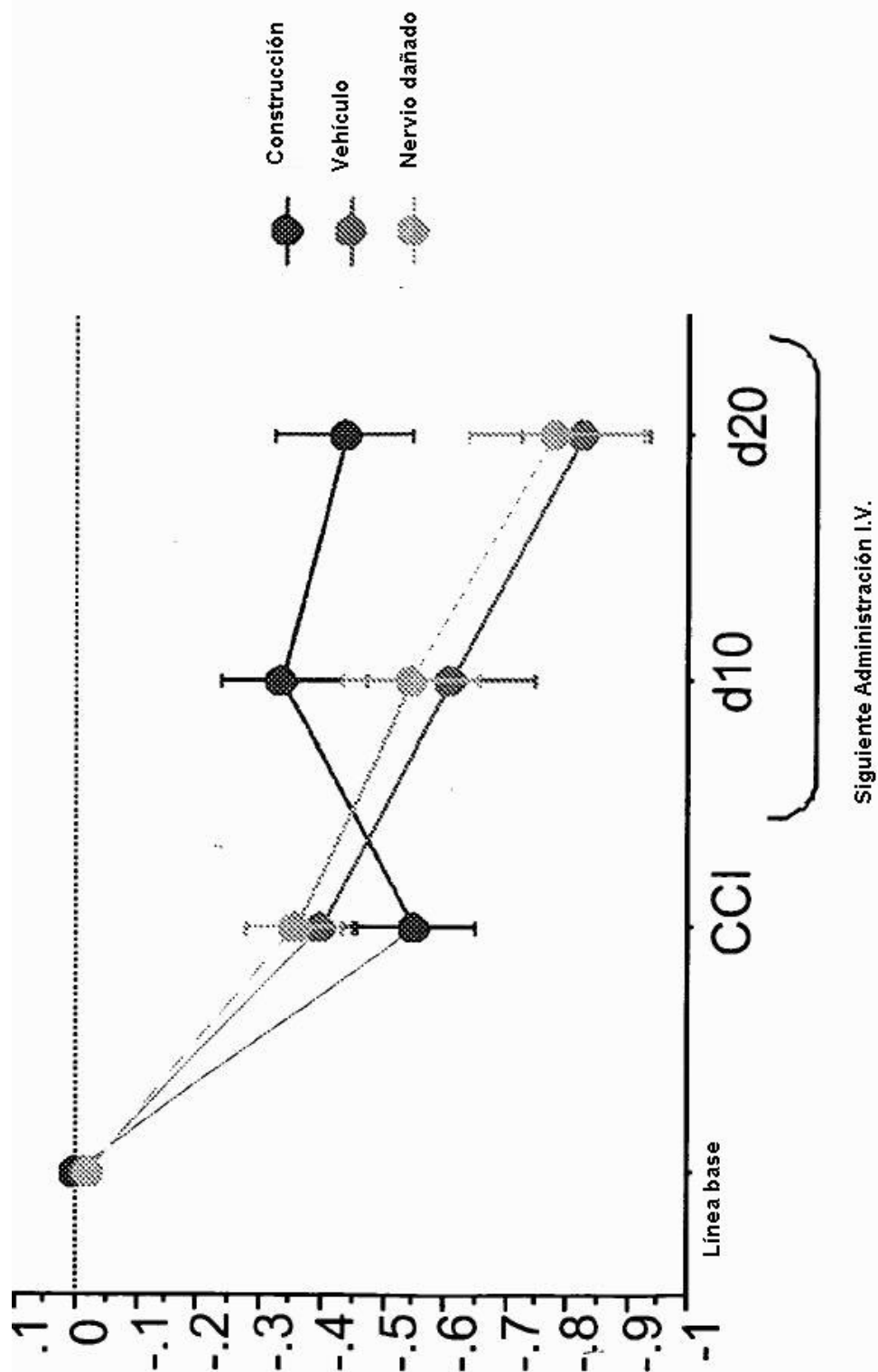


Figura 3

Colágeno (Colbar) Lado afectado

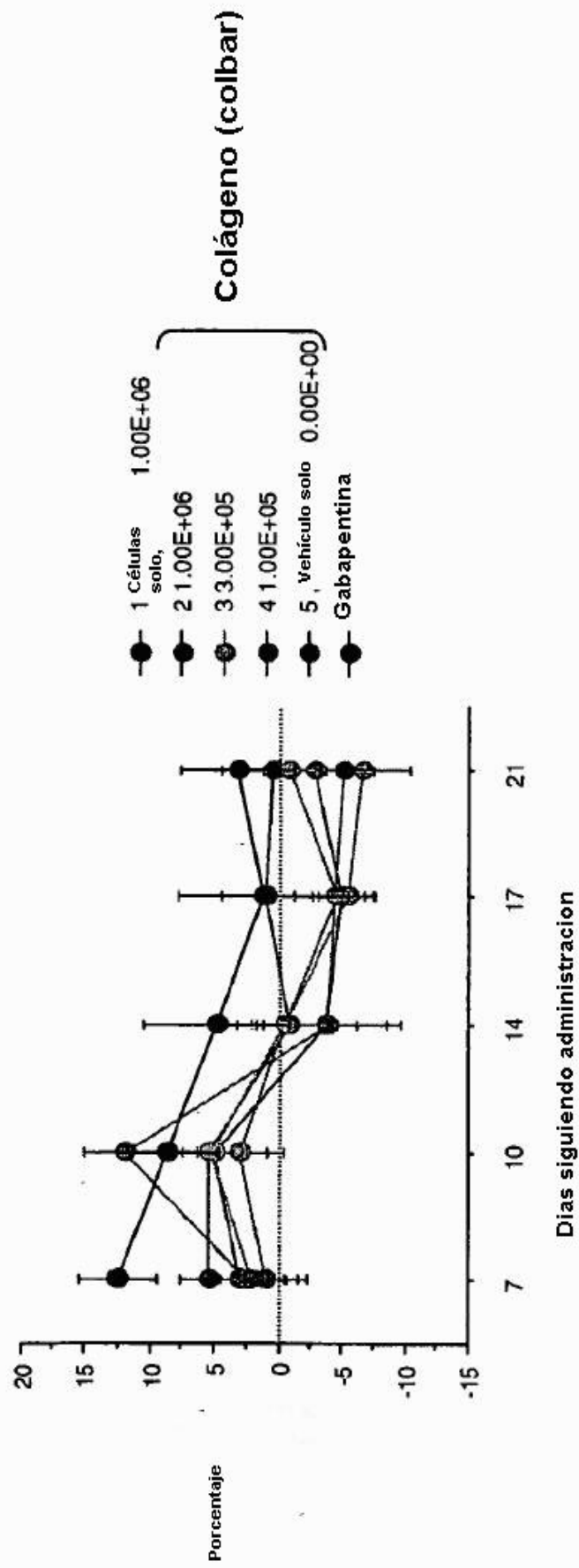


Figura 4

Colágeno (Colbar) Lado contralateral

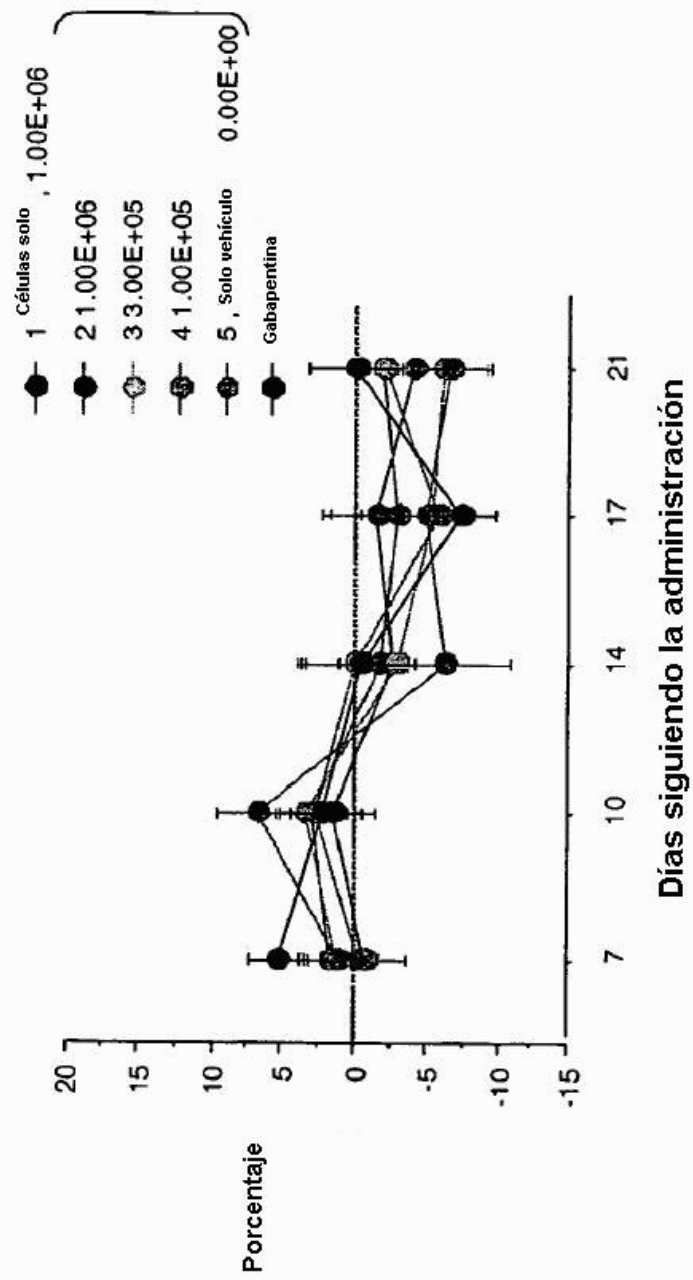


Figura 5

Evicel (Omnix) Lado afectado

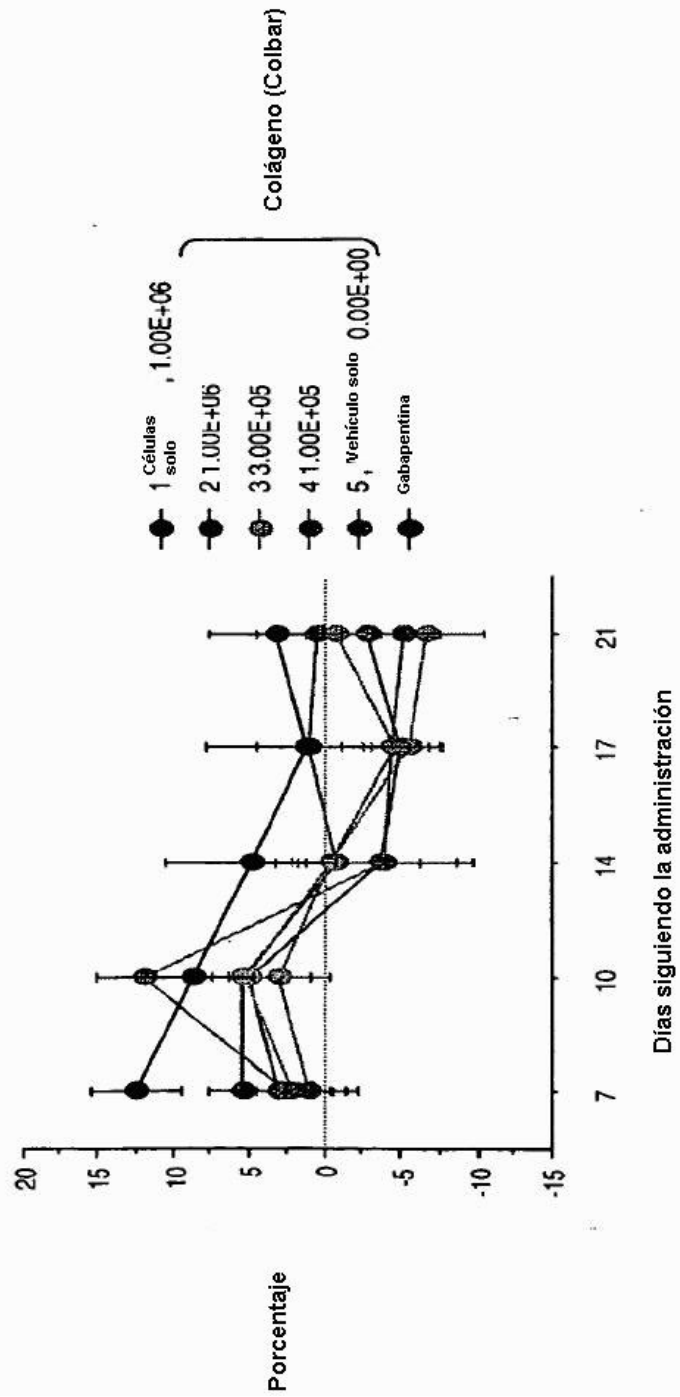


Figura 6

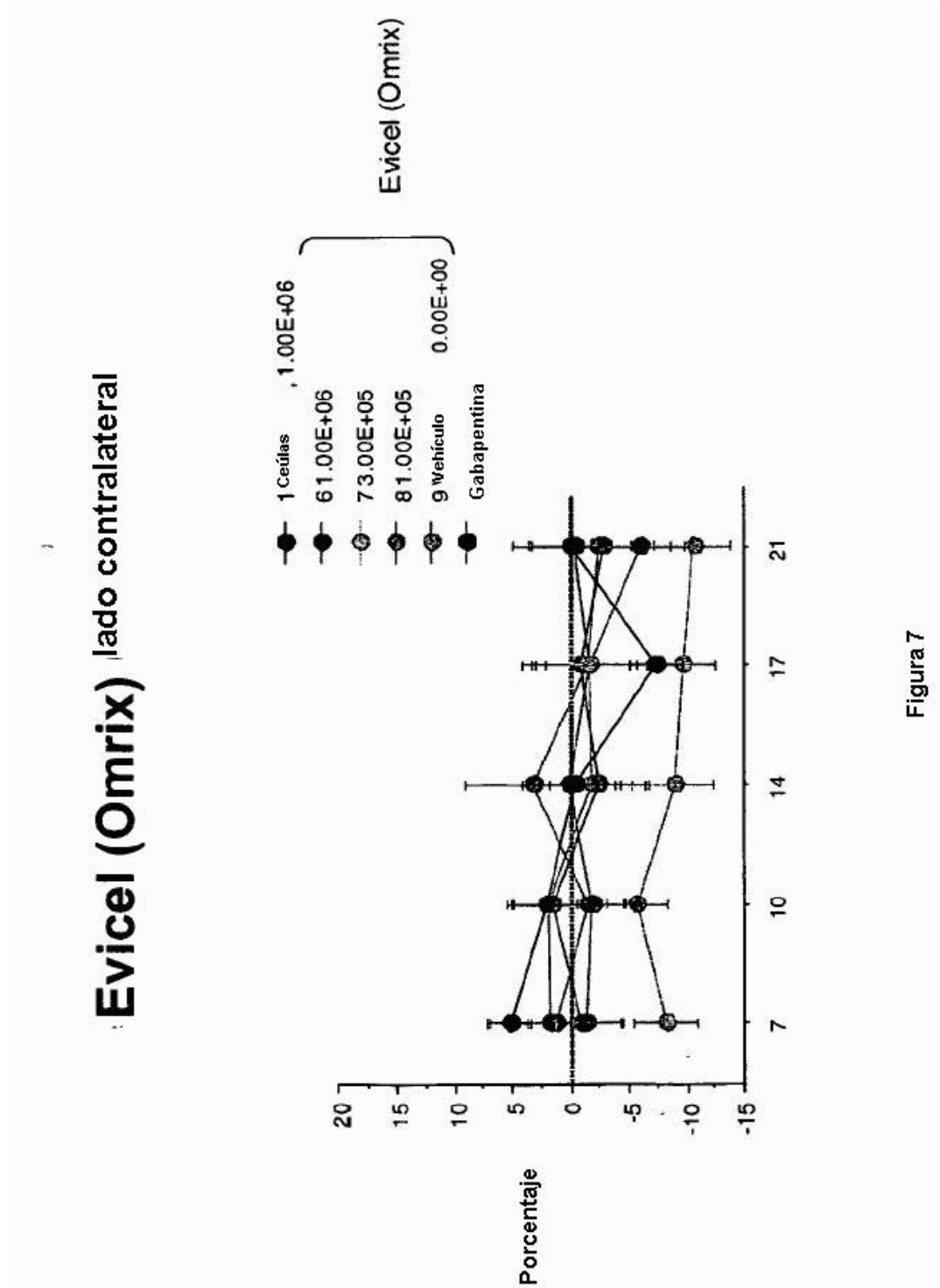


Figura 7

Figura 8: Lado afectado de administración sistémica

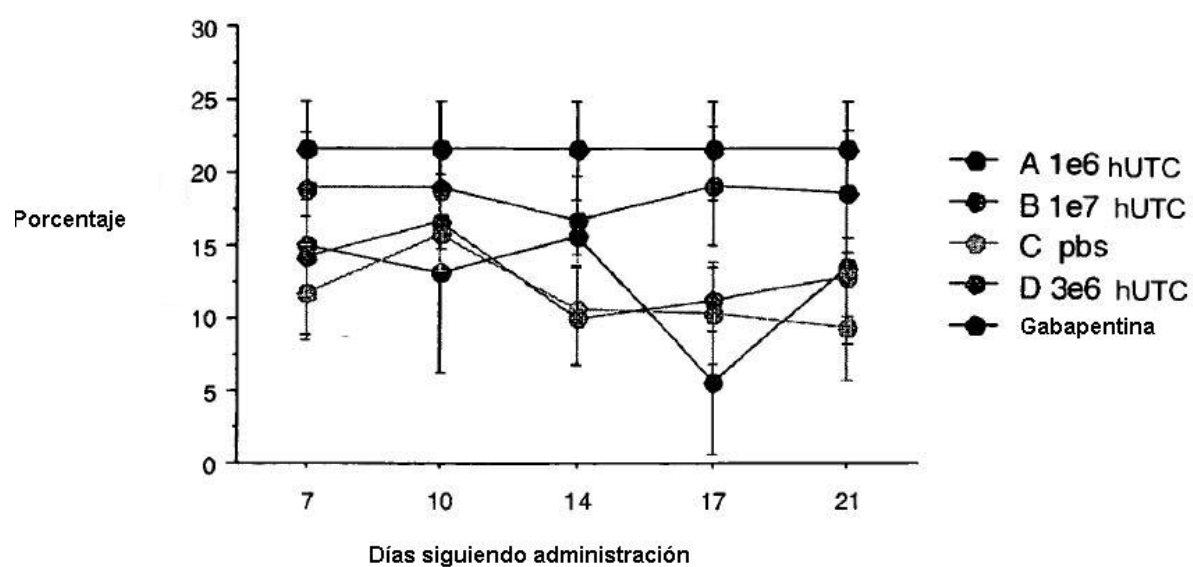


Figura 9: Lado contralateral administración sistémica

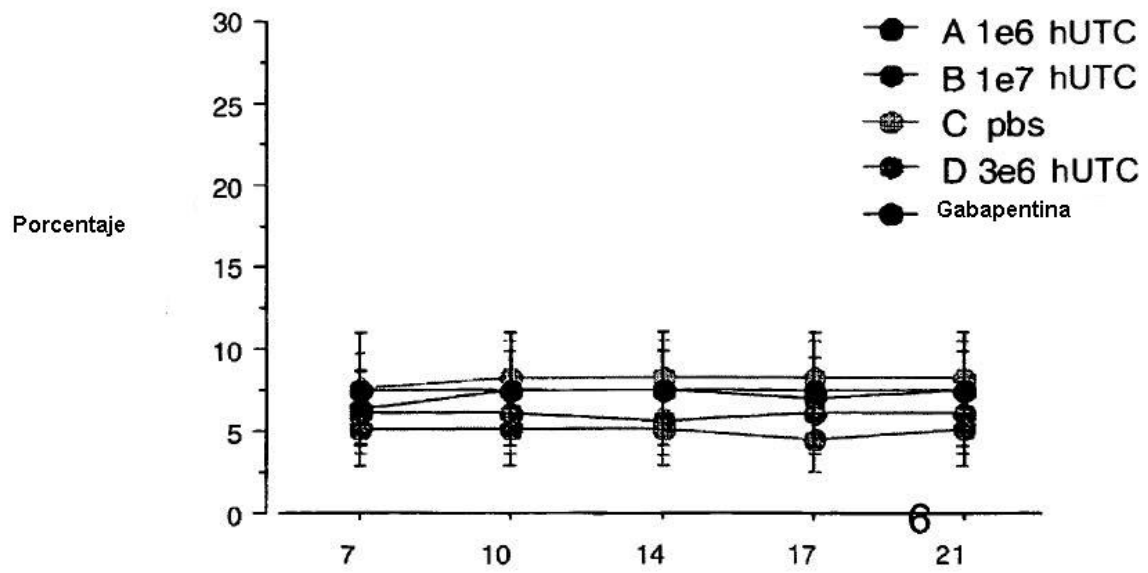


Figura 10A

	Significa	Dev. Tp.	Std. Error	Cuenta	Mínimo	Máximo	# perdido
%changeNPL7, Total	4.268	10.440	1.348	60	-12.679	30.667	1
%changeNPL7, 1	3.125	14.387	4.550	10	-12.679	28.947	0
%changeNPL7, 2	5.351	7.231	2.287	10	-6.827	14.744	0
%changeNPL7, 3	2.071	7.753	2.452	10	-7.453	13.514	0
%changeNPL7, 4	2.465	10.146	3.059	11	-11.350	24.153	0
%changeNPL7, 5	1.122	10.861	3.434	10	-10.548	21.749	0
%changeNPL7	12.477	9.015	3.005	9	1.136	30.667	0
%changeNPL10, Total	6.613	10.447	1.349	60	-13.5690	32.731	1
%changeNPL10, 1	5.108	13.226	4.182	10	-10.225	28.947	0
%changeNPL10, 2	5.425	9.155	2.895	10	-8.835	19.258	0
%changeNPL10, 3	5.236	6.881	2.176	10	-4.142	13.514	0
%changeNPL10, 4	11.923	10.318	3.111	11	0.000	32.731	0
%changeNPL10, 5	3.030	10.659	3.371	10	-13.590	17.494	0
%changeNPL10	8.627	11.546	3.849	9	-9.848	24.051	0
%changeNPL14, Total	-870	15.189	1.961	60	-22.364	40.084	1
%changeNPL14, 1	-3.634	15.510	4.905	10	-19.691	25.877	0
%changeNPL14, 2	-703	12.469	3.943	10	-21.769	17.633	0
%changeNPL14, 3	-470	8.424	2.664	10	-14.004	13.080	0
%changeNPL14, 4	-3.942	19.131	5.768	11	-22.364	32.731	0
%changeNPL14, 5	-421	18.265	5.776	10	-16.497	40.084	0
%changeNPL14	4.829	16.844	5.615	9	-13.576	30.667	0
%changeNPL17, Total	-2.998	11.143	1.439	60	-28.788	24.889	1
%changeNPL17, 1	-5.047	7.773	2.458	10	-15.058	6.579	0
%changeNPL17, 2	1.012	11.196	3.540	10	-15.953	19.363	0
%changeNPL17, 3	-5.487	7.156	2.263	10	18.146	5.063	0
%changeNPL17, 4	-4.381	10.695	3.225	11	-16.429	20.316	0
%changeNPL17, 5	-4.683	6.826	2.160	10	-17.177	8.747	0
%changeNPL17	1.149	19.875	6.625	9	-28.788	24.889	0
%changeNPL21, Total	-2.103	10.925	1.410	60	-36.884	30.667	1
%changeNPL21, 1	-2.819	11.673	3.691	10	-15.251	19.737	0
%changeNPL21, 2	.422	12.917	4.085	10	-20.408	20.833	0
%changeNPL21, 3	-6.691	12.040	3.807	10	-36.884	6.962	0
%changeNPL21, 4	-5.073	7.854	2.368	11	-22.201	2.784	0
%changeNPL21, 5	-.819	6.178	1.954	10	-13.776	8.925	0
%changeNPL21	3.186	13.247	4.416	9	-13.636	30.667	0

Los resultados totales podrían no estar de acuerdo con los resultados de células individuales por los valores de variables divididas

Figura 10B: Medidas repetidas ANOVA

		D	Suma de cuadrados	Significado	Valor-F	Valor-P	Lambda	Poder
Código		5	1711.52	.342.30	.74	.591	3.74	.24
.24		5	24714.32	.457.67				
Categoría por unidad compacta variable	#1	4	4167.01	.1041.75	170.04	<.000	68.19	1.00
Categoría por unidad compacta variable	#	2	1223.62	.61.18	1.00	.461	20.02	.73
Categoría por unidad compacta variable	#	21	13198.36	.61.10				

Figure 10C

Fisher's PLSD para Categoría por unidad compacta variable #1

Efecto: códigos

Nivel de significancia: 5%

Exclusión fila: dos sesiones locales.svd

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
1, 2	-2.955	4.783	.2250	
1, 3	.415	4.783	.8646	
1, 4	-8.52	4.673	.7200	
1, 5	-.300	4.783	.9020	
1, GP	-6.707	4.914	.0076	S
2, 3	3.370	4.783	.1667	
2, 4	2.103	4.673	.3765	
2, 5	2.655	4.783	.2755	
2, GP	-3.752	4.914	.1340	
3, 4	-1.267	4.673	.5942	
3, 5	-.714	4.783	.7690	
3, GP	-7.122	4.914	.0046	S
4, 5	.552	4.673	.8162	
4, GP	-5.855	4.807	.0171	S
5, GP	-6.408	4.914	.0108	S

Figura 11A Colbar, Administración Local, Contralateral (Derecho)

	Significado	Dev. Tip.	Std. Error	Cuenta	Mínimo	Máximo	# Perdido
%changeNPR7, Total	1.308	6.885	.889	60	-14.940	18.143	1
%changeNPR7, 1	-.851	9.114	2.882	10	-14.940	15.976	0
%changeNPR7, 2	1.658	5.912	1.870	10	-4.819	14.385	0
%changeNPR7, 3	1.282	5.621	1.778	10	-9.653	6.909	0
%changeNPR7, 4	1.081	8.795	2.652	11	-12.131	18.143	0
%changeNPR7, 5	-.176	4.837	1.530	10	-7.241	8.918	0
%changeNPR7, GP	5.277	5.637	1.879	9	0.000	15.976	0
%changeNPR10, Total	3.257	8.143	1.051	60	-16.106	24.051	1
%changeNPR10, 1	1.432	9.353	2.958	10	-8.494	19.756	0
%changeNPR10, 2	2.775	7.393	2.338	10	-8.844	14.385	0
%changeNPR10, 3	3.365	5.122	1.620	10	-4.826	13.043	0
%changeNPR10, 4	6.658	9.694	2.923	11	-3.607	24.051	0
%changeNPR10, 5	2.680	8.894	2.812	10	-8.876	15.068	0
%changeNPR10, GP	2.185	8.428	2.809	9	-16.106	11.787	0
%changeNPR14, Total	-2.416	13.118	1.693	60	-28.033	24.051	1
%changeNPR14, 1	-2.589	11.501	3.637	10	-15.816	19.756	0
%changeNPR14, 2	-1.678	16.260	5.142	10	-23.593	19.258	0
%changeNPR14, 3	-3.017	11.342	3.587	10	-16.266	13.514	0
%changeNPR14, 4	-6.176	15.827	4.772	11	-28.033	24.051	0
%changeNPR14, 5	-.124	12.970	4.101	10	-16.497	20.988	0
%changeNPR14, GP	-3.29	11.984	3.995	9	-19.388	15.976	0
%changeNPR17, Total	-4.669	10.874	1.404	60	-26.557	22.051	1
%changeNPR17, 1	-1.580	11.865	3.752	10	-19.388	19.756	0
%changeNPR17, 2	-2.953	14.213	4.495	10	-23.980	19.712	0
%changeNPR17, 3	-5.379	6.034	1.908	40	-13.818	3.106	0
%changeNPR17, 4	-5.038	15.547	4.688	11	-26.557	24.051	0
%changeNPR17, 5	-5.889	7.727	2.444	10	-18.367	7.968	0
%changeNPR17, GP	-7.413	7.023	2.341	9	-17.766	4.255	0
%changeNPR21, Total	-3.532	9.967	1.287	60	-21.811	21.875	1
%changeNPR21, 1	-4.048	7.911	2.502	10	-14.796	6.773	0
%changeNPR21, 2	-1.823	15.416	4.875	10	-20.748	21.875	0
%changeNPR21, 3	-6.057	9.715	3.072	10	-21.811	5.405	0
%changeNPR21, 4	-6.579	9.877	2.987	11	-18.367	12.346	0
%changeNPR21, 5	-2.004	5.401	1.708	10	-13.776	5.625	0
%changeNPR21, GP	-.028	9.617	3.206	9	-12.415	15.976	0

Los resultados totales podrían no estar de acuerdo con las células individuales debido a valores perdidos en variables divididas

Figura 11B: Medidas Repetidas ANOVA

	D	Suma de cuadrados	Significado	Valor-F	Valor-P	Lambda a	Poder
Código	5	160,867	.32,173	.094	.9929	.468	.069
Sujeto (Grupo)	54	18574,584	.343,974				
Categoría por unidad compacta variable #1	4	2652,443	.663,111	14,421	<.0001	57,682	1,000
Categoría por unidad compacta variable #	20	1030,210	.51,510	1,120	.3303	22,404	.798
Categoría por unidad compacta variable #	216	9932,466	.45,984				

Figura 11C

Fisher's PLSD para unidad compacta variable

#1

Efecto: códigos

Nivel de significancia : 5%

Fila exclusión: Dos sesiones locales.svd

	Sig. Dif.	Crit. Dif.	Valor-P
1, 2	-1.123	4.122	.5923
1, 3	.434	4.122	.8360
1, 4	.483	4.027	.8134
1, 5	-.424	4.122	.8396
1, GP	-1.466	4.235	.4964
2, 3	1.557	4.122	.4579
2, 4	1.606	4.027	.4331
2, 5	.699	4.122	.7390
2, GP	-.343	4.235	.8736
3, 4	.049	4.027	.9807
3, 5	-.858	4.122	.6823
3, GP	-1.899	4.235	.3781
4, 5	-.908	4.027	.6577
4, GP	-1.949	4.143	.3553
5, GP	-1.014	4.235	.6288

Figura 12A: Estadísticas descriptivas

Dividido por: Códigos

Exclusión fila: Dos sesiones locales.svd

	Mean	Std. Dev.	Std. Error	Count	Minimum	Maximum	# Missing
%changeNPL7, Total	4.593	12.516	1.643	58	-22.653	44.118	0
%changeNPL7, 1	2.271	14.989	4.996	9	-12.679	28.947	0
%changeNPL7, 6	2.069	10.540	3.333	10	-15.577	19.756	0
%changeNPL7, 7	-4.145	9.773	3.091	10	-22.653	13.514	0
%changeNPL7, 8	11.501	16.742	5.294	10	-6.694	44.118	0
%changeNPL7, 9	3.944	4.503	1.424	10	-2.761	11.243	0
%changeNPL7, GP	12.477	9.015	3.005	9	1.136	30.667	0
%changeNPL10, Total	4.620	11.254	1.478	58	-19.796	36.427	0
%changeNPL10, 1	5.053	14.027	4.676	9	-10.225	28.947	0
%changeNPL10, 6	-.297	9.770	3.090	10	-15.577	16.904	0
%changeNPL10, 7	-1.999	9.149	2.893	10	-19.796	10.811	0
%changeNPL10, 8	9.558	11.523	3.644	10	-4.435	36.427	0
%changeNPL10, 9	7.223	8.393	2.654	10	-1.266	24.051	0
%changeNPL10, GP	8.627	11.546	3.849	9	-9.848	24.051	0
%changeNPL14, Total	1.152	17.138	2.250	58	-40.179	44.118	0
%changeNPL14, 1	-3.395	16.432	5.477	9	-19.691	25.877	0
%changeNPL14, 6	-.471	16.578	5.242	10	-34.909	20.833	0
%changeNPL14, 7	-5.945	18.602	5.883	10	-40.179	20.000	0
%changeNPL14, 8	12.089	14.486	4.581	10	-2.761	44.118	0
%changeNPL14, 9	-.282	17.581	5.559	10	-29.344	23.026	0
%changeNPL14, GP	4.829	16.844	5.615	9	-13.576	30.667	0
%changeNPL17, Total	-2.716	15.021	1.972	58	-40.182	37.255	0
%changeNPL17, 1	-4.428	7.979	2.660	9	-15.058	6.579	0
%changeNPL17, 6	-2.800	17.094	5.406	10	-40.182	17.544	0
%changeNPL17, 7	-5.615	13.130	4.152	10	-25.179	20.000	0
%changeNPL17, 8	.736	18.924	5.984	10	-32.967	37.255	0
%changeNPL17, 9	-5.123	12.315	3.894	10	-25.290	16.245	0
%changeNPL17, GP	1.149	19.875	6.625	9	-28.788	24.889	0
%changeNPL21, Total	-9.42	13.621	1.789	58	-28.205	44.118	0
%changeNPL21, 1	-1.888	11.981	3.994	9	-15.251	19.737	0
%changeNPL21, 6	-.527	11.392	3.602	10	-16.182	14.257	0
%changeNPL21, 7	-4.195	12.039	3.807	10	-19.165	15.976	0
%changeNPL21, 8	3.198	19.058	6.027	10	-22.344	44.118	0
%changeNPL21, 9	-5.110	13.613	4.305	10	-28.205	8.439	0
%changeNPL21, GP	3.186	13.247	4.416	9	-13.636	30.667	0

Figura 12B: Medidas repetidas ANOVA

Tabla ANOVA para Unidad Compacta Variable

#1

Fila exclusión: Dos sesiones locales.svd

	DF	suma de cuadrados	Cuadrado significado	Valor-F	Valor-P	Lambda	Poder
Código de brian	5	4855.881	971.176	1.699	.1514	8.495	.537
Sujeto (Grupo)	52	29725.262	571.640				
Categoría para unidad variable #1	4	2522.899	630.725	6.413	<.0001	25.653	.994
Categoría para unidad variable #	20	1289.137	64.457	.655	.8662	13.108	.494
Categoría para unidad variable #	208	20456.483	98.348				

Figura 12 C

Fisher's PLSD para Unidad Compacta Variable

#1

Efecto: códigos

Nivel de significancia: 5%

Fila exclusión: Dos sesiones locales.svd

	Sig. Dif.	Crit. Dif.	Valor-P	
1, 6	-.072	5.575	.9797	
1, 7	3.902	5.575	.1694	
1, 8	-7.894	5.575	.0057	S
1, 9	-.608	5.575	.8302	
1, GP	-6.531	5.720	.0254	S
6, 7	3.975	5.427	.1505	
6, 8	-7.822	5.427	.0049	S
6, 9	-.536	5.427	.8461	
6, GP	-6.459	5.575	.0233	S
7, 8	-11.796	5.427	<.0001	S
7, 9	-4.510	5.427	.1030	
7, GP	-10.433	5.575	.0003	S
8, 9	7.286	5.427	.0087	S
8, GP	1.363	5.575	.6308	
9, GP	-5.923	5.575	.0374	S

Figura 13A: Estadísticas descriptivas

Divididas por: códigos

Fila exclusión: dos sesiones locales.svd

	Significado	DV. Tip.	Std. Error	cuenta	Mínimo	Máximo	# Perdido
%changeNPR7, Total	-.478	10.899	1.431	58	-24.390	36.111	0
%changeNPR7, 1	-.946	9.661	3.220	9	-14.940	15.976	0
%changeNPR7, 6	-1.406	9.735	3.079	10	-08.122	19.756	0
%changeNPR7, 7	-8.203	8.739	2.763	10	-24.390	4.255	0
%changeNPR7, 8	1.151	17.935	5.672	10	-17.347	36.111	0
%changeNPR7, 9	1.784	6.247	1.976	10	-6.620	13.077	0
%changeNPR7, GP	5.277	5.637	1.879	9	0.000	15.976	0
%changeNPR10, Total	-.668	9.376	1.231	58	-21.911	19.756	0
%changeNPR10, 1	1.592	93906	3.302	9	-8.494	19.756	0
%changeNPR10, 6	-1.938	9.204	2.911	10	-21.911	14.868	0
%changeNPR10, 7	-5.778	8.197	2.292	10	-17.422	4.255	0
%changeNPR10, 8	-1.586	9.411	2.976	10	+15.816	1.3514	0
%changeNPR10, 9	2.030	10.623	3.359	10	-14.286	19.270	0
%changeNPR10, GP	2.185	8.428	2.809	9	-16.106	11.787	0
%changeNPR14, Total	-1.707	13.825	1.815	58	-24.390	36.111	0
%changeNPR14, 1	-2.366	12.176	40.59	9	-15.816	190756	0
%changeNPR14, 6	.128	12.520	3.959	10	-17.517	15.385	0
%changeNPR14, 7	-8.894	11.376	3.597	10	-22.449	8.889	0
%changeNPR14, 8	3.2345	18.280	5.781	10	-21.429	36.111	0
%changeNPR14, 9	-1.945	15.496	4.900	10	-24.390	19.270	0
%changeNPR14, GP	-.329	11.984	3.995	9	-19.388	15.976	0
%changeNPR17, Total	-3.830	12.904	1.694	58	-24.390	29.167	0
%changeNPR17, 1	-1.038	12.452	4.151	9	-19.388	19.756	0
%changeNPR17, 6	-1.684	15.716	4.970	10	-22.959	19.028	0
%changeNPR17, 7	-9.706	9.184	2.904	10	-21.429	8.889	0
%changeNPR17, 8	-1.468	17.794	5.627	10	-20.557	29.167	0
%changeNPR17, 9	-1.752	12.239	3.870	10	-24.390	16.430	0
%changeNPR17, GP	-7.413	7.023	2.341	9	17.766	4.255	0
%changeNPR21, Total	-3.828	13.385	1.758	58	-25.261	36.111	0
%changeNPR21, 1	-2.854	7.373	2.458	9	-13.435	6.773	0
%changeNPR21, 6	-.464	16.815	5.317	10	-23.980	19.756	0
%changeNPR21, 7	-10.553	10.572	3.373	10	-21.986	8.889	0
%changeNPR21, 8	-2.510	19.563	6.186	10	-24.237	36.111	0
%changeNPR21, 9	-6.085	11.882	3.575	10	-26.261	17.143	0
%changeNPR21, GP	-.02	9.617	3.026	9	-12.415	15.976	0

Figura 13B

Medidas Repetidas ANOVA

	DI ²	Suma de cuadrados	Sig. Cuadrado	Valor-F	Valor-P	Lambda	Poder
Códigos	5	2627.471	525.494	1.112	.3657	5.558	.357
sujeto (grupo)	52	24583.144	472.753				
Categoría por unidad compacta variable #1	4	644.348	161.087	2.381	.0528	9.524	.678
Categoría por unidad compacta variable #	20	1097.413	54.871	.811	.6988	16.221	.612
Categoría por unidad compacta variable #	208	14072.086	67.654				

Figura 13 C

Fisher's PLSD para unidad compacta variable #1

Efecto: códigos

Nivel de Significancia: 5%

Fila exclusión: Dos sesiones locales.svd

	Sig. Dif.	Crit. Dif.	Valor-P
1, 6	-.050	8.965	.9911
1, 7	7.504	8.965	.0990
1, 8	-.887	8.965	.8435
1, 9	.071	8.965	.9873
1, GP	-1.061	9.198	.8179
6, 7	7.554	8.726	.0883
6, 8	-.837	8.726	.8481
6, 9	.121	8.726	.9779
6, GP	-1.011	8.965	.8219
7, 8	-8.391	8.726	.0591
7, 9	-7.433	8.726	.0934
7, GP	-8.565	8.965	.0607
8, 9	.958	8.726	.8265
8, GP	-.174	8.965	.9691
9, GP	-1.132	8.965	.8010

Figura 14A: Estadísticas descriptivas

Dividido por: Columna 1

Fila exclusión: ad. sistémica..svd

	sig.	Dev. Tip.	Std. Error	Cuenta	Mínimo	Máximo	#perdido
%impL7d, Total	16.058	12.508	1.805	48	-4.762	62.881	0
%impL7d, A	14.925	19.125	6.048	10	-4.762	62.881	0
%impL7d, B	18.955	11.626	3.677	10	2.564	36.427	0
%impL7d, C	11.759	10.276	3.250	10	0.000	29.930	0
%impL7d, D	14.199	8.847	2.798	10	-1.195	24.051	0
%impL7d, Neurontine	21.549	9.508	3.362	8	5.000	31.544	0
%imoL10d, Total	17.006	12.016	1.734	48	-21.318	62.881	0
%imoL10d, A	13.080	21.392	6.765	10	-21.318	62.881	0
%imoL10d, B	18.930	9.335	2.952	10	2.564	36.427	0
%imoL10d, C	15.838	7.865	2.487	10	0.000	29.930	0
%imoL10d, D	16.541	5.973	1.889	10	6.909	24.051	0
%imoL10d, Neurontine	21.549	9.508	3.362	8	5.000	31.544	0
%imoL14d, Total	14.618	12.716	1.835	48	-10.357	62.881	0
%imoL14d, A	15.648	18.349	5.803	10	0.000	62.881	0
%imoL14d, B	16.642	9.827	3.108	10	-5.128	27.610	0
%imoL14d, C	10.615	11.816	3.736	10	-10.357	29.930	0
%imoL14d, D	10.021	10.560	3.339	10	-4.382	24.051	0
%imoL14d, Neurontine	21.549	9.508	3.362	8	5.000	31.544	0
%improL17d, Total	13.249	12.722	1.836	48	-19.388	36.427	0
%improL17d, A	5.695	16.080	5.085	10	-19.388	29.930	0
%improL17d, B	19.074	12.944	4.093	10	0.000	36.427	0
%improL17d, C	10.381	11.174	3.533	10	-7.600	29.930	0
%improL17d, D	11.206	6.920	2.188	10	0.000	24.051	0
%improL17d, Neurontine	21.549	9.508	3.362	8	5.000	31.544	0
%impproL21d, Total	14.913	12.428	1.794	48	-14.966	49.584	0
%impproL21d, A	13.449	16.173	5.114	10	-14.966	49.584	0
%impproL21d, B	18.606	13.101	4.143	10	-2.930	36.427	0
%impproL21d, C	9.434	11.716	3.705	10	-7.143	29.930	0
%impproL21d, D	12.856	8.432	2.666	10	-7.143	29.930	0
%impproL21d, Neurontine	21.549	9.508	3.362	8	5.000	31.544	0

Figura 14B

Medidas Repetidas

ANOVA

	DF	Suma de cuadrados	Sig. Cuadrado	Valor-F	Valor-P	Lambda	Poder
Columna 1	4	3650.118	912.530	1.488	.2231	5.951	.413
Sujeto (Grupo)	42	25761.082	613.359				
Categoría para Unidad compacta variable #1	4	304.291	76.073	2.125	.0798	8.502	.616
Categoría para Unidad compacta variable #	16	895.051	55.941	1.563	.0839	25.007	.887
Categoría para Unidad compacta variable #	168	6013.093	35.792				

Figura 14C

Fisher's PLSD

Efecto: Columna 1

Nivel de significancia : 5%

Fila Exclusión: ad.svd sistémico

	Dif. Sig.	Dif. Crit.	Valor-P
A,B	-6.844	10.270	.1859
A, C	.954	9.996	.8482
A, D	-.405	9.996	.9352
A, Neurontine	-8.989	10.602	.0945
B, C	7.798	10.270	.1329
B, D	6.439	10.270	.2128
B, Neurontine	-2.145	10.861	.6922
C, D	-1.359	9.996	.7851
C, Neurontine	-9.943	10.602	.0653
D, Neurontine	-8.584	10.602	.1098

Figura 15A

Estadísticas Descriptivas

Dividida por: Columna 1

Fila Exclusión: ad sistémico..svd

	Mean	Std. Dev.	Std. Error	Count	Minimum	Maximum	# Missing
%impR7d, Total	6.668	7.412	1.081	47	-1.361	24.051	0
%impR7d, A	6.411	6.712	2.123	10	-1.361	19.270	0
%impR7d, B	6.824	8.305	2.768	9	0.000	24.051	0
%impR7d, C	7.638	6.411	2.027	10	-1.361	15.976	0
%impR7d, D	5.119	7.522	2.379	10	0.000	19.270	0
%impR7d, Neurontine	7.536	9.637	3.407	8	0.000	24.051	0
%impR10d, Total	7.045	7.575	1.105	47	0.000	24.051	0
%impR10d, A	7.494	7.195	2.275	10	0.000	19.270	0
%impR10d, B	6.824	8.305	2.768	9	0.000	24.051	0
%impR10d, C	8.327	6.701	2.119	10	0.000	15.976	0
%impR10d, D	5.119	7.522	2.379	10	0.000	19.270	0
%impR10d, Neurontine	7.539	9.637	3.407	8	0.000	24.051	0
%impR14d, Total	6.919	7.331	1.069	47	0.000	24.051	0
%impR14d, A	7.494	7.195	2.275	10	0.000	19.270	0
%impR14d, B	6.168	6.886	2.295	9	0.000	18.143	0
%impR14d, C	8.327	6.701	2.119	10	0.000	15.976	0
%impR14d, D	5.119	7.522	2.379	10	0.000	19.270	0
%impR14d, Neurontine	7.536	9.637	3.407	8	0.000	24.051	0
%impR17d, Total	6.823	7.547	1.101	47	-4.762	24.051	0
%impR17d, A	7.018	7.872	2.489	10	-4.762	19.270	0
%impR17d, B	6.824	8.305	2.768	9	0.000	24.051	0
%impR17d, C	8.327	6.701	2.119	10	0.000	15.976	0
%impR17d, D	4.551	6.477	2.048	10	0.000	15.976	0
%impR17d, Neurontine	7.536	9.637	3.407	8	0.000	24.051	0
%impR21d, Total	7.045	7.575	1.105	47	0.000	24.051	0
%impR21d, A	7.494	7.195	2.275	10	0.000	19.270	0
%impR21d, B	6.824	8.305	2.768	9	0.000	24.051	0
%impR21d, C	8.327	6.701	2.119	10	0.000	15.976	0
%impR21d, D	5.119	7.522	2.379	10	0.000	19.270	0
%impR21d, Neurontine	7.536	9.637	3.407	8	0.000	24.051	0

Figura 15B

Medidas repetidas ANOVA

		DF	Suma de cuadrados	Sig. Cuadrado	Valor-F	Valor-P	Lambda	Poder
Columna 1		4	3650.118	912.530	1.488	.2231	5.951	.413
Sujeto (Grupo)		42	25761.082	613.359				
Categoría para Unidad Compacta Variable	#1	4	304.291	76.073	2.125	.0798	8.502	.616
Categoría para Unidad Compacta Variable	#	16	895.051	55.941	1.563	.0839	25.007	.887
Categoría para Unidad Compacta Variable	:#	168	6013.093	35.792				

Figura 15C

Fisher's PLSD

Efecto: Columna 1

Nivel de Significancia: 5%

Exclusión fila: ad sistémico.svd

	Sig. Dif.	Dif. Crit.	Valor-P
A,B	-6.844	10.270	.1859
A, C	.954	9.996	.8482
A, D	-.405	9.996	.9352
A, Neurontine	-8.989	10.602	.0945
B, C	7.798	10.270	.1329
B, D	6.439	10.270	.2128
B, Neurontine	-2.145	10.861	.6922
C, D	-1.359	9.996	.7851
C, Neurontine	-9.943	10.602	.0653
D, Neurontine	-8.584	10.602	.1098

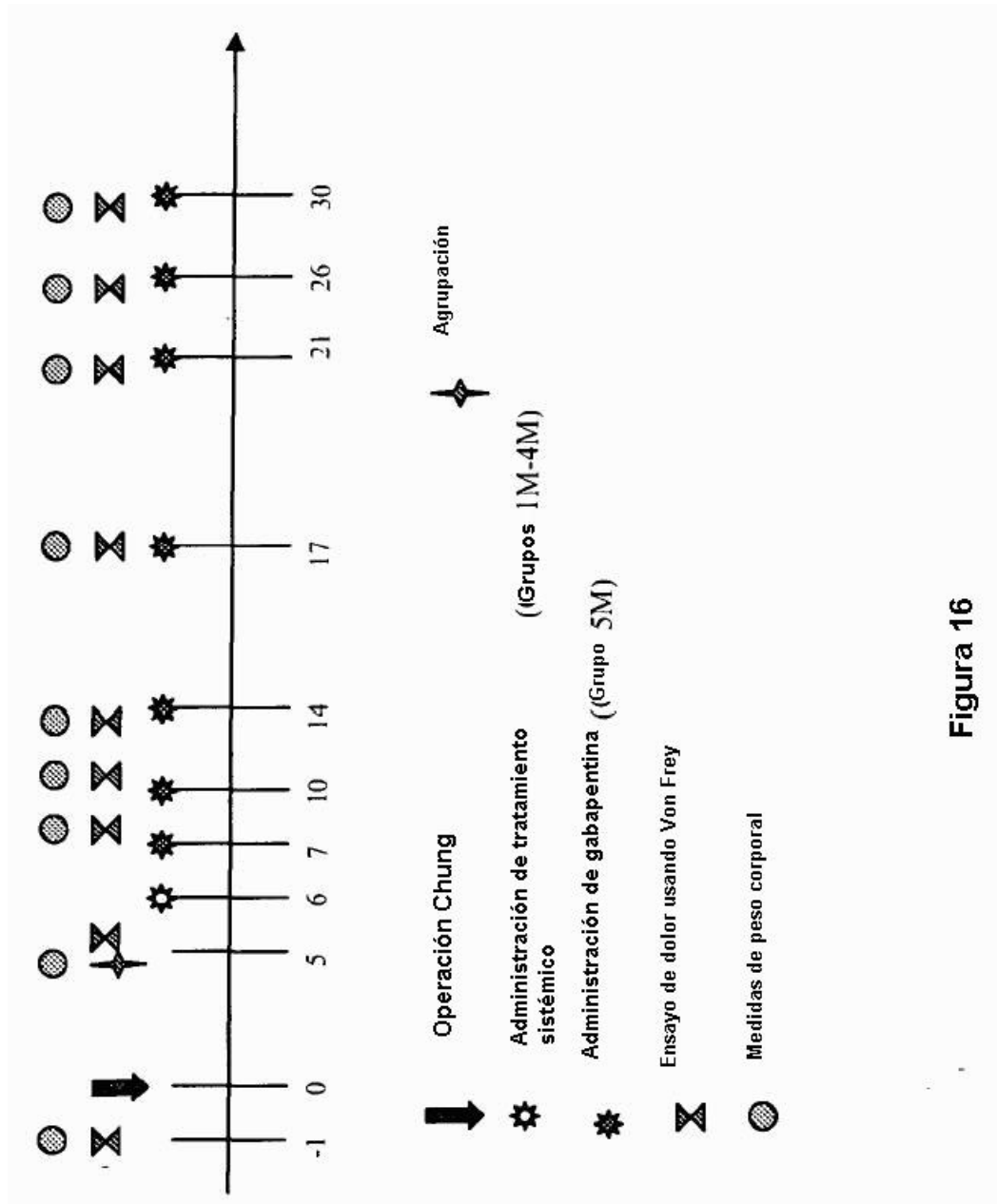


Figura 16

Figura 17
Media de peso corporal (g)

Grupo No.	Objeto prueba	Línea base	Día 5	Día 7	Día 10	Día 14	Día 17	Día 21	Día 26	Día 30
MEDIAS										
4M	Vehículo	189.25	222.50	223.33	242.08	264.25	273.92	285.67	300.00	313.75
1M	Células 1*10 ⁶	192.00	220.67	222.58	242.50	262.92	276.58	289.17	307.00	320.83
2M	Células 3*10 ⁶	192.75	220.33	222.33	241.92	262.50	275.75	290.50	308.75	323.83
3M	Células 10*10 ⁶	195.00	227.33	229.50	249.33	268.42	282.67	301.25	321.17	335.42
5M	Gabapentina 150 mg/kg	1940.08	226.00	236.33	254.33	270.58	282.50	298.17	312.08	325.25
SEMS										
4M	Vehículo	2.86	4.90	4.47	4.86	4.95	5.10	5.72	6.96	6.65
1M	Células 1*10 ⁶	3.28	3.95	3.88	4.36	4.72	5.18	5.74	6.05	6.51
2M	Células 3*10 ⁶	2.85	3.81	4.14	4.03	3.90	3.80	3.94	4.91	5.05
3M	Células 10*10 ⁶	3.54	4.14	4.95	5.24	4.81	5.25	5.69	6.15	7.89
5M	Gabapentina 150 mg/kg	3.53	3.86	3.94	3.89	4.64	4.82	4.86	5.80	5.76

Figura 18

Ganancia de peso tras cirugía Chung y tratamientos hUTC
por administración sistémica (g)

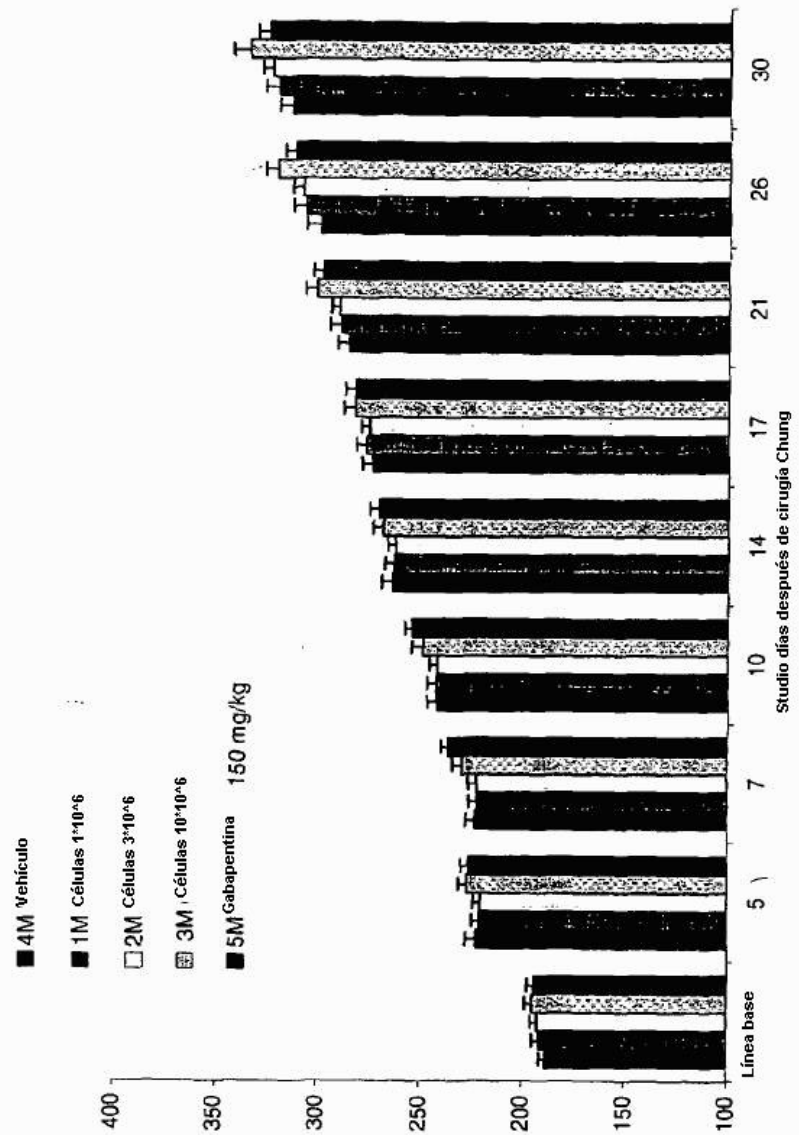


Figura 19

Media delta de respuesta Von Frey

(g). Cálculo: media de la pierna derecha menos media de la pierna izquierda

Grupo lto.	Objeto prueba	Línea base	Día 5	Día 7	Día 10	Día 14	Día 17	Día 21	Día 26	Día 30
MEDIA										
4M	Vehículo	0.00	46.58	48.08	40.25	32.25	35.83	36.92	46.67	48.42
1M	Células 1*10 ⁶	0.00	46.67	28.08 *&	15.67 #^	24.58 ^	25.25 ^	23.17 &	27.92 #&	41.92
2M	Células 3*10 ⁶	0.00	47.25	33.08 *	17.33 *^	27.00 &	15.50 *^	32.75	34.75	28.58 #^
3M	Células 10*10 ⁶	0.00	46.58	23.58 #^	21.25 ^	16.58 ^	20.00 ^	9.67 #^	18.83 #^	27.92 #^
5M	Gabapentina 150 mg/kg	0.00	45.17	14.92 #^	7.92 #^	3.75 #^	0.00 #^	0.00 #^	2.83 #^	14.17 #^
SEMS										
4M	Vehículo	0.00	3.01	2.02	5.82	5.98	6.41	4.34	2.68	2.85
1M	Células 1*10 ⁶	0.00	2.79	7.30	6.18	7.42	7.64	7.86	5.88	3.84
2M	Células 3*10 ⁶	0.00	2.77	6.07	6.73	6.99	5.67	5.88	5.53	4.95
3M	Células 10*10 ⁶	0.00	2.30	6.26	7.23	6.40	6.60	6.99	8.25	5.58
5M	Gabapentina 150 mg/kg	0.00	3.66	6.46	5.35	2.90	0.00	0.00	2.83	5.05

* = p<0.05 vs. Vehículo

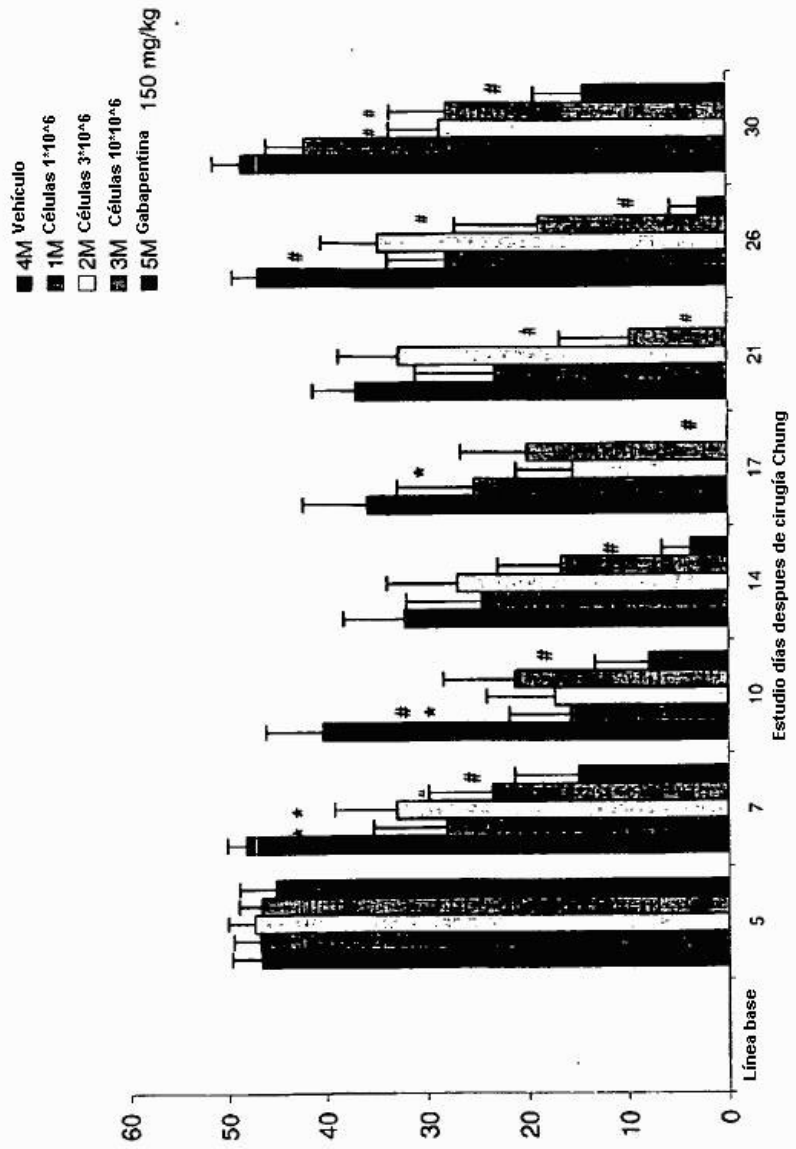
& = p<0.5 vs. pretratamiento (día 5)

= p<0.01 vs. Vehículo

^ = p<0.01 vs. pretratamiento (día 5)

Figura 20
Media delta de respuesta Von Frey a retirada de pierna tras cirugía Chung y tras administración sistémica de hUTC en estudio de día 6 (g)

* = $p < 0.05$ vs. Vehículo
 # = $p < 0.01$ vs. Vehículo



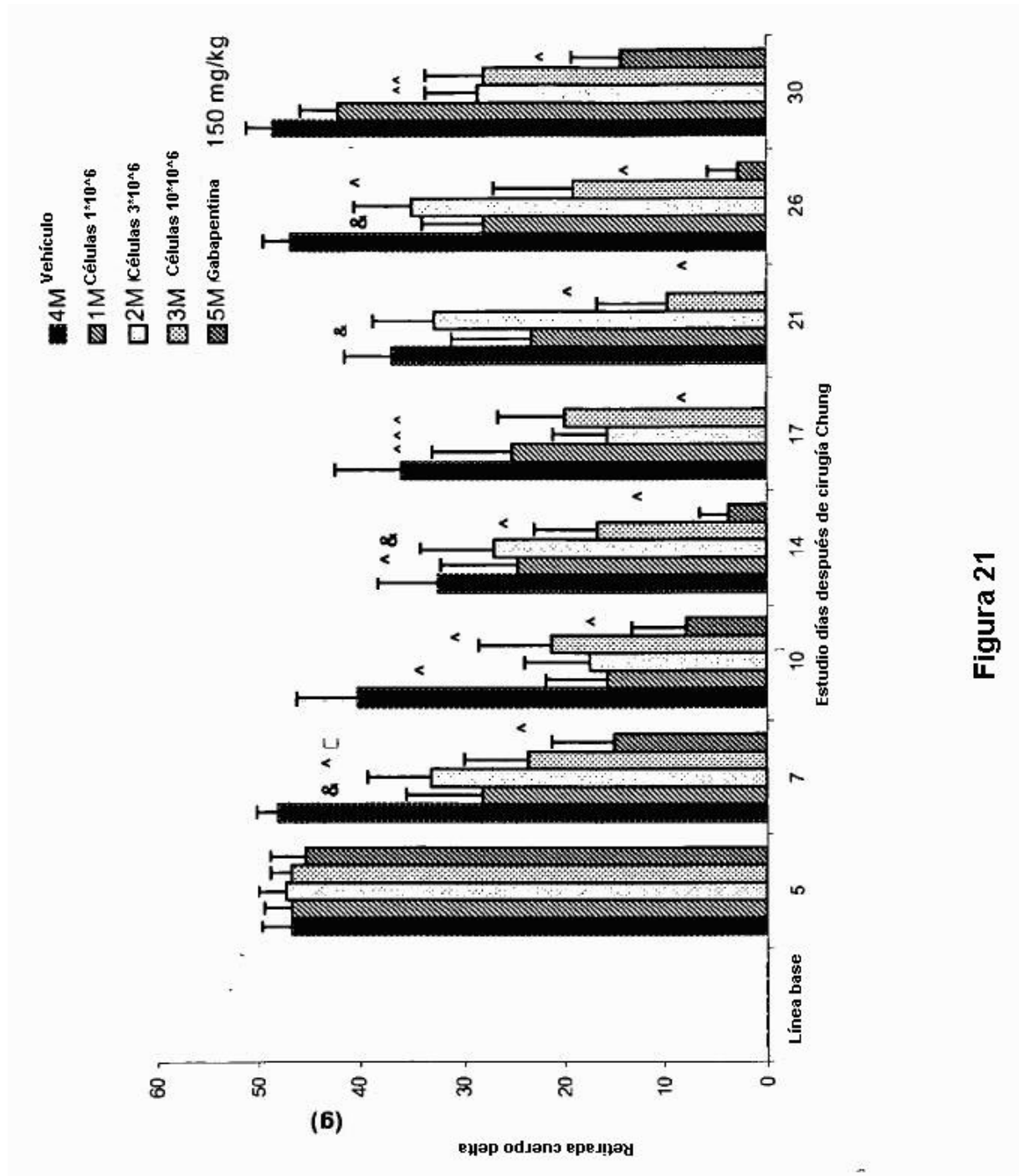


Figura 21

Figura 22
Media de Examinación Von Frey (Log R / Log L).

Grupo No.	Objeto de prueba	Línea base	Día 5	Día 7	Día 10	Día 14	Día 17	Día 21	Día 26	Día 30
MEDIA										
4M	Vehículo	1.00	1.16	1.17	1.15	1.12	1.12	1.14	1.15	1.18
1M	Células 1*10 ⁶	1.00	1.17	1.10 *	1.05 *	1.08	1.09	1.08	1.11 *	1.14 *
2M	Células 3*10 ⁶	1.00	1.18	1.10 *	1.06 *	1.08	1.04 #	1.10	1.11 *	1.10 #
3M	Células 10*10 ⁶	1.00	1.16	1.07 #	1.08	1.06	1.07	1.03 #	1.07 #	1.10 #
5M	Gabapentina 150 mg/kg	1.00	1.17	1.04 #	1.02 #	1.01 #	1.00 #	1.00 #	1.01 #	1.03 #
SEMS										
4M	Vehículo	0.00	0.01	0.02	0.03	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01
1M	Células 1*10 ⁶	0.00	0.01	0.03	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.01
2M	Células 3*10 ⁶	0.00	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01
3M	Células 10*10 ⁶	0.00	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02
5M	Gabapentina 150 mg/kg	0.00	0.03	0.02	0.02	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01

* = p<0.05 vs. Vehículo
 # = p<0.01 vs. Vehículo

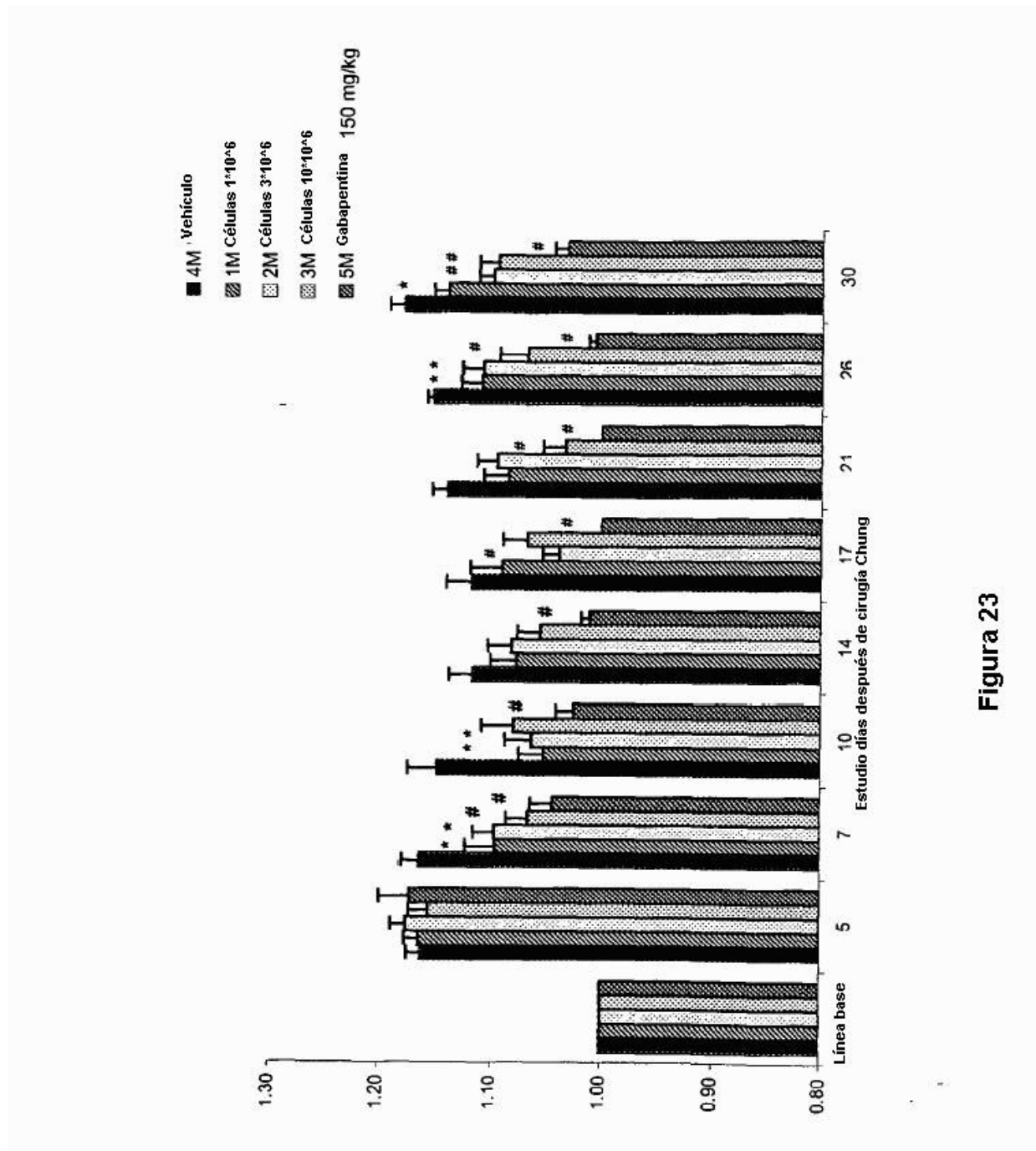


Figura 23

Figura 24A

Grupo #	Tratamiento	Animal #	Línea base	Día 5	Día 7	Día 10	Día 14	Día 17	Día 21	Día 26	Día 30
1M	Células 1×10^6	1	201	228	225	245	266	278	283	301	321
		7	188	219	220	246	272	288	309	331	351
		12	181	215	216	237	258	273	288	304	325
		20	168	198	197	214	232	242	253	266	274
		26	197	233	230	256	281	294	306	321	341
		31	192	212	212	231	251	267	277	294	303
		36	196	234	241	265	289	308	320	339	351
		46	191	213	214	230	247	258	267	288	303
		51	196	212	220	239	257	269	280	296	307
		57	181	209	217	235	260	276	293	315	330
		61	210	248	246	267	283	296	313	330	333
		76	203	227	233	245	259	270	281	299	311
2M	Células 3×10^6	2	179	202	199	215	236	244	260	270	291
		8	184	191	194	222	251	274	293	318	332
		13	182	218	217	236	257	274	289	310	328
		21	189	220	226	247	269	280	289	310	323
		27	260	233	239	261	282	293	305	322	335
		32	198	225	222	241	263	276	288	305	321
		37	188	228	231	247	262	276	289	303	316
		40	200	218	220	237	256	274	288	307	322
		42	198	228	233	252	271	284	304	323	342
		56	182	214	216	234	249	260	273	285	292
		62	207	237	238	258	277	286	300	326	343
		68	206	230	233	253	277	288	308	326	341

Figura 24B: Peso corporal individual (g) (continuado)

Grupo #	Tratamiento	Animal #	Línea base	Día 5	Día 7	Día 10	Día 14	Día 17	Día 21	Día 26	Día 30
3M	Células 10*10 ⁶	3	203	224	227	244	268	278	295	315	335
		5	179	210	205	219	242	254	273	291	302
		23	179	209	208	229	253	266	284	306	322
		25	195	233	231	260	282	303	324	342	364
		33	192	233	237	255	278	290	305	328	338
		38	176	205	205	222	239	253	266	280	274
		43	194	228	233	257	277	300	317	340	363
		45	205	233	235	254	273	290	299	311	327
		48	192	223	225	247	268	280	293	319	331
		50	202	231	236	257	279	292	317	337	349
		69	211	248	256	276	266	277	318	340	354
		72	212	251	256	272	296	309	324	345	366
4M	Vehículo	10	193	219	221	236	259	266	283	299	312
		19	172	193	194	211	233	245	255	273	284
		24	187	216	221	237	257	266	274	284	294
		28	173	201	203	223	247	257	270	280	294
		29	182	213	213	232	255	265	280	295	312
		34	194	225	231	247	267	279	291	293	312
		39	191	224	225	243	265	275	289	309	323
		49	194	228	229	250	277	275	294	315	325
		55	188	218	221	241	260	271	265	265	286
		63	207	245	251	272	294	307	321	344	356
		71	198	234	242	267	291	305	320	338	351
		73	192	254	229	246	266	276	286	305	316

Figura 24C
Peso corporal Individual (continuado)

Grupo #	Tratamiento	Animal #	Línea base	Día 5	Día 7	Día 10	Día 14	Día 17	Día 21	Día 26	Día 30
5M	Gabapentina 150 mg /kg	6	178	210	220	238	252	267	282	296	304
		9	175	201	211	235	248	257	279	286	300
		22	189	218	224	239	252	263	280	290	305
		30	199	238	247	271	291	308	326	341	358
		35	206	237	245	268	283	306	323	346	360
		44	203	238	255	265	279	296	308	323	340
		47	183	215	228	244	259	274	283	304	317
		53	182	217	230	245	259	276	292	296	314
		65	202	243	252	271	295	299	317	335	337
		70	212	236	245	261	280	284	293	309	322
		77	196	230	240	259	277	278	294	305	319
		78	204	229	239	256	272	282	301	314	327

Figura 25A: Respuesta Von Frey Individual (g)

Grupo #	Tratamiento	Animal #	Línea base		Día 5		Día 7		Día 10		Día 14		Día 17		Día 21		Día 26		Día 30	
			R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L
1M	Células 1*10 ⁶	1	60	60	60	15	60	60	8	60	60	60	60	60	60	60	26	10	60	26
		7	60	60	60	15	60	60	60	26	60	60	60	60	60	60	60	10	60	8
		12	60	60	60	8	60	60	60	60	60	60	60	60	60	10	60	10	60	26
		20	60	60	26	8	60	15	60	60	60	60	60	60	60	26	60	8	60	8
		26	60	60	60	10	60	10	60	60	60	60	60	10	60	10	26	8	60	10
		31	60	60	60	15	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	15	60	15
		36	60	60	60	6	60	8	60	6	60	10	60	6	26	8	26	26	60	10
		46	60	60	60	10	60	26	60	60	60	15	60	10	60	10	60	8	26	10
		51	60	60	60	6	60	6	60	10	60	10	60	6	26	6	26	8	60	8
		57	60	60	60	10	60	60	60	26	60	60	60	60	26	60	26	8	60	10
2M	Células 3*10 ⁶	61	60	60	60	8	60	10	26	10	26	26	60	10	60	15	26	10	26	8
		76	60	60	60	15	60	60	60	60	60	60	60	15	60	15	60	60	60	10
		2	60	60	60	15	60	26	60	60	60	60	60	60	60	26	60	10	60	10
		8	60	60	60	6	60	10	60	8	60	10	60	26	60	15	60	10	26	8
		13	60	60	26	4	60	10	60	8	60	15	60	26	60	26	60	10	26	8
		21	60	60	60	8	60	10	60	8	60	10	60	60	60	10	60	10	26	10
		27	60	60	60	8	60	10	26	8	60	10	60	10	60	60	26	8	60	15
		32	60	60	60	10	26	26	26	26	60	60	60	60	60	15	60	26	60	26
		37	60	60	60	26	60	26	60	26	60	10	60	60	60	15	60	15	60	15
		40	60	60	60	8	60	26	60	60	60	15	60	26	60	15	60	8	26	10
		42	60	60	60	8	60	10	60	60	60	60	60	60	60	60	60	26	60	15
		56	60	60	60	10	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	26	60	15
		62	60	60	60	8	60	15	60	60	60	60	60	26	60	10	60	60	26	15
		68	60	60	60	8	60	60	60	60	60	26	60	60	60	15	60	60	60	60

Figura 25B: Respuesta Von Frey individual (g) (continuada)

Grupo #	Tratamiento	Animal #	Línea base		Día 5		Día 7		Día 10		Día 14		Día 17		Día 21		Día 26		Día 30		
			R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	
3M	Células 10*10 ⁶	3	60	60	60	10	60	26	60	26	60	50	60	60	60	26	26	60	60	26	
		5	60	60	60	15	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	15	
		23	60	60	60	26	60	26	60	26	15	60	26	60	26	60	10	60	26	26	
		25	60	60	60	10	60	8	60	10	60	15	60	10	60	60	60	8	26	10	
		33	60	60	60	10	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	15	
		38	60	60	60	26	60	26	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	15	15	
		43	60	60	60	6	60	60	60	60	60	60	60	60	26	60	26	60	60	10	
		45	60	60	60	10	60	60	60	60	60	60	60	60	60	25	10	60	60	60	
		48	60	60	60	6	60	15	60	6	60	8	60	8	15	15	60	8	26	10	
		50	60	60	60	6	60	10	60	6	26	8	26	8	26	60	60	10	26	10	
		69	60	60	60	26	60	60	60	60	60	50	60	60	60	60	60	60	15	26	10
		72	60	60	60	10	60	26	60	8	60	10	60	8	60	10	60	10	60	60	8
4M	Vehículo	10	60	60	60	8	60	8	60	8	60	10	60	10	60	10	60	10	60	10	
		19	60	60	60	10	60	26	60	15	60	10	60	10	60	15	50	10	60	8	
		24	60	60	60	10	60	15	60	10	60	10	60	26	60	26	50	10	60	8	
		28	60	60	26	8	60	6	60	6	60	6	60	6	26	6	60	8	60	15	
		29	60	60	60	8	60	26	60	60	60	50	60	60	60	26	60	10	60	10	
		34	60	60	60	15	60	10	60	26	60	60	60	60	60	10	50	15	60	8	
		39	60	60	60	10	60	10	60	60	26	10	60	15	26	6	60	10	60	6	
		49	60	60	60	6	60	8	60	6	26	8	60	15	60	10	60	10	60	6	
		55	60	60	60	10	60	8	60	6	26	8	60	8	26	8	26	8	26	8	
		63	60	60	60	8	60	10	60	26	60	15	60	10	26	10	60	10	60	8	
		71	60	60	60	8	60	6	60	8	60	8	60	10	60	8	60	10	60	10	
		73	60	60	60	26	60	10	60	6	60	26	60	60	60	6	60	15	60	8	

Figura 25C

Respuesta Von Frey Individual (g) (continuada)

Grupo #	Tratamiento	animal #	Línea base		Día 5		Día 7		Día 10		Día 14		Día 17		Día 21		día 26		día 30	
			R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L
5M	Gabapentina 150 mg/kg	6	60	60	60	10	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	26	26
		9	60	60	60	6	60	60	60	10	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
		22	60	60	60	26	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	26
		30	60	60	60	8	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	26
		35	60	60	60	4	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
		44	60	60	26	10	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
		47	60	60	60	4	60	60	60	15	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
		53	60	60	60	4	26	60	26	26	26	26	26	26	60	60	26	60	60	60
		65	60	60	60	26	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	26
		70	60	60	60	10	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	26
		77	60	60	60	26	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	26
		78	60	60	60	10	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	26	60	60	60