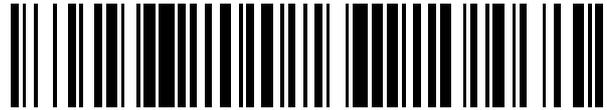


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 718**

51 Int. Cl.:

C12N 5/073 (2010.01)

A61K 35/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2008 E 08835175 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.09.2014 EP 2203186**

54 Título: **Reparación y regeneración de tejido renal mediante células derivadas de tejido de cordón umbilical humano**

30 Prioridad:

05.10.2007 US 977775 P

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

29.12.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**COLTER, DAVID y
GOSIEWSKA, ANNA**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 525 718 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).

Reparación y regeneración de tejido renal mediante células derivadas de tejido de cordón umbilical humano**Descripción****5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS**

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos N° 60/977.775, presentada el 5 de octubre de 2007, cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia, en su totalidad.

10 CAMPO

La invención se refiere en general al campo de la terapia celular. Más concretamente, la invención se refiere a células derivadas de tejido de cordón umbilical humano para su uso en el tratamiento de un paciente con lesión o insuficiencia renal aguda o enfermedad renal crónica.

ANTECEDENTES

A lo largo de toda la memoria descriptiva se citan diversas publicaciones, incluidas patentes, solicitudes publicadas, artículos técnicos y artículos académicos. Cada una de estas publicaciones citadas se incorpora por referencia en el presente documento, en su totalidad y para todos los fines.

La enfermedad renal es un problema médico grave no satisfecho, con una carga anual de costos en EE.UU. superior a 27 mil millones de dólares. En la actualidad, más de 40 millones de estadounidenses corren el riesgo de padecer o padecen una enfermedad renal, y la incidencia está aumentando a una tasa alarmante del 6% anual. Por lo tanto, para el año 2020, se estima que una de cada cuatro personas tendrá una enfermedad renal terminal (ERT), que necesitará diálisis o trasplante de riñón. Para mitigar estos problemas económicos y médicos, se necesitan tecnologías de transformación novedosas para el tratamiento de la insuficiencia renal aguda (IRA) y la enfermedad renal crónica (ERC).

La insuficiencia renal aguda, también conocida como necrosis tubular aguda, es un síndrome común que afecta hasta a un 7% de todos los pacientes hospitalizados (Kelly *et al.* (2000) Semin. Nephrol. 1:4-19). La IRA es la pérdida súbita de la capacidad de los riñones para excretar desechos, concentrar la orina y conservar los electrolitos. La IRA se produce con mayor frecuencia después de que un individuo se exponga a agentes nefrotóxicos o después de un evento isquémico-de perfusión. Otras causas incluyen la infección, la obstrucción del tracto urinario y algunos trastornos sanguíneos y autoinmunitarios. Estas lesiones inducen daños en el componente funcional del riñón, la nefrona. Más concretamente, las células del túbulo proximal se necrotizan. A continuación, las células de los túbulos se desprenden de la membrana basal tubular, obstruyendo el diámetro interior del túbulo. Esta obstrucción conduce a un aumento en la presión intratubular, que provoca fugas de filtrado de la nefrona al parénquima renal circundante. La reducción de la función de la nefrona y la acumulación de filtrado en el tejido renal conduce a una disminución en la velocidad de filtración glomerular, y en última instancia se produce la insuficiencia renal. Aunque la IRA es un trastorno grave y potencialmente mortal, es reversible.

Se han propuesto varios métodos terapéuticos, destinados a reducir o eliminar la IRA. Sobre todo, se emplean con frecuencia técnicas de diálisis avanzadas. No obstante, la tasa de mortalidad entre los pacientes con IRA en diálisis sigue siendo un 30%-80%, lo que indica que la diálisis tiene poco valor terapéutico en el tratamiento de la IRA. (Morigi *et al.* (2004) J. Am. Soc. Nephrol. 15:1794-804). Además, los tratamientos con fármacos tales como dopamina, furosemida, manitol o la administración de péptido natriurético atrial, han fracasado en los estudios clínicos (Haug *et al.* (1993) Transplantation 55:766-772; Lieberthal y Nigam (2000) J. Am. Physiol. Renal Physiol. 278: F1-F12). Estos datos sugieren que la estrategia tradicional para desarrollar un tratamiento para la IRA es insuficiente y que debe aplicarse una nueva lógica.

La recuperación de la función renal después de la IRA depende de la sustitución de las células necróticas del túbulo con epitelio tubular funcional. Después de la lesión, los túbulos son capaces de autorreparación, formando nuevas células del túbulo proximal para reemplazar las células defectuosas o necróticas. Se desconoce el origen de las células progenitoras que dan lugar a nuevas células del túbulo. Sin embargo, es posible que la regeneración tubular siga el paradigma descrito de las células madre/células amplificadoras de tránsito para regenerar más rápidamente los sistemas orgánicos.

Estudios recientes han demostrado que las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (MSC) son renoprotectoras y ayudan a reparar los riñones después de la IRA de origen medicamentoso y la inducida por isquemia (Morigi *et al.* 2004). También se ha demostrado recientemente que la administración intracarotídea de 1×10^6 MSC por rata con lesión por isquemia/reperfusión daba como resultado una mejora significativa de la función renal (Togel *et al.* (2005) Am. J. Physiol. Renal Physiol. 289(1):F31-42). Se demostró adicionalmente que los efectos protectores de las MSC eran independientes de la diferenciación de las células madre, sino más bien eran el resultado de la secreción de factores tróficos renoprotectores.

A diferencia de la IRA, la enfermedad renal crónica (ERC) es una pérdida gradual y progresiva de la función renal. Por lo general es irreversible y, en última instancia, conduce a la enfermedad renal terminal. En los Estados Unidos, la ERC es cada vez más común y se asocia con malas consecuencias para la salud y elevados costos médicos. La National Kidney Foundation estima que 20 millones de estadounidenses padecen ERC y que al menos 20 millones de personas más corren el riesgo de desarrollar ERC. Si no se trata, la ERC puede conducir a una significativa morbilidad y mortalidad por anemia, desequilibrios de electrolitos, enfermedad ósea, enfermedad cardiovascular e insuficiencia renal.

La enfermedad renal progresiva es el resultado de una combinación de la lesión por una enfermedad inicial (por ejemplo, hipertensión), seguida de una respuesta renal mal adaptada a esa lesión. Una respuesta de este tipo incluye la producción de citocinas proinflamatorias y profibróticas y factores de crecimiento. Por lo tanto, una estrategia para retrasar la evolución de la ERC es mejorar la respuesta inflamatoria y fibrótica, así como reparar o revertir el daño renal existente. Se ha demostrado que la administración de factores de crecimiento puede retrasar la evolución de la ERC. Por ejemplo, la proteína morfogénica ósea-7 (BMP-7) impedía la atrofia tubular, la inflamación intersticial y la fibrosis en ratas con obstrucción ureteral unilateral. Del mismo modo, la administración de BMP-7 reducía la fibrosis tubulointersticial y la glomeruloesclerosis en el modelo de ratón MRL lpr/lpr de nefritis lúpica. Además, el factor de crecimiento de hepatocitos ha demostrado tener una potente eficacia antiinflamatoria y antifibrótica en una gran diversidad de modelos animales de lesión renal. Otros factores terapéuticamente prometedores incluyen el factor de crecimiento transformante- β 1, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento de tejido conjuntivo, el factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2), las interleucinas, el factor de necrosis tumoral y la proteína 1 quimiotáctica para monocitos. Todos estos estudios demuestran que la administración de factores de crecimiento es un enfoque terapéutico prometedor para el tratamiento preventivo de la ERC.

A pesar de las opciones de tratamiento médico existentes, las tasas de mortalidad siguen siendo muy altas y la incidencia de la enfermedad renal está en aumento. Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de un tratamiento mejorado, potencialmente curativo. Hoy en día, ninguna intervención terapéutica intenta detener o incluso revertir la evolución de la enfermedad renal. La presente invención proporciona métodos terapéuticos con efectos renoprotectores muy prometedores y que promueven la regeneración renal endógena, reemplazan las células renales necróticas y en última instancia, previenen la ERT.

RESUMEN

Según un aspecto, la invención proporciona células obtenidas de tejido de cordón umbilical humano para su uso en métodos para el tratamiento de un paciente con lesión o insuficiencia renal aguda o enfermedad renal crónica. Por ejemplo, el daño al riñón puede estar inducido por la edad, un traumatismo, la exposición a toxinas, la exposición a fármacos, la exposición a radiación, la oxidación, la deposición de inmunocomplejos o el rechazo de trasplante. Los métodos comprenden administrar al paciente células derivadas de tejido de cordón umbilical en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad o el daño. El tejido de cordón umbilical a partir del cual se obtienen las células está sustancialmente libre de sangre. Las células derivadas de tejido de cordón umbilical son capaces de autorrenovarse y desarrollarse en cultivo y tienen el potencial de diferenciarse, por ejemplo, a un fenotipo de riñón; necesitan L-valina para crecer; son capaces de crecer en atmósferas que contienen oxígeno del 5% al 20%; no producen CD117 ni HLA-DR; expresan alfa-actina de músculo liso; y expresan, en comparación con una célula madre mesenquimal, célula de médula ósea de cresta ilíaca o fibroblasto humano mayores niveles de receptor 1 de lipoproteínas de baja densidad oxidadas, interleucina 8 o reticulón 1. En algunas formas de realización, las células derivadas de tejido de cordón umbilical expresan receptor 1 de lipoproteínas de baja densidad oxidadas, reticulón, ligando 3 del receptor de quimiocinas y/o proteína 2 quimiotáctica para granulocitos. En aspectos preferentes, las células derivadas de tejido de cordón umbilical expresan CD10, CD13, CD44, CD73 y CD90. En algunas formas de realización, las células derivadas de tejido de cordón umbilical son inducidas *in vitro* para que se diferencien a células del linaje renal antes de administrarse al paciente. Las células derivadas de tejido de cordón umbilical pueden modificarse genéticamente para que expresen un producto génico que promueva la reparación y/o regeneración del tejido renal. En algunas formas de realización de la invención, las células derivadas de tejido de cordón umbilical se administran con al menos otro tipo de célula, tal como pero sin limitarse a, una célula epitelial del túbulo proximal, célula epitelial del asa de Henle, célula del túbulo distal, célula del conducto colector, célula parietal glomerular, podocito glomerular, célula mesangial, célula del endotelio vascular, célula intersticial u otra célula madre multipotencial o pluripotencial. El al menos otro tipo de célula puede administrarse simultáneamente con, o antes, o después, de las células derivadas de tejido de cordón umbilical. En algunos aspectos de la invención, las células derivadas de tejido de cordón umbilical se administran con al menos un agente. El agente puede administrarse simultáneamente con, antes de, o después de la administración de las células derivadas de tejido de cordón umbilical. En algunos aspectos preferentes de la invención, las células derivadas de tejido de cordón umbilical ejercen un efecto trófico sobre el riñón del paciente. Según algunos aspectos de la invención, las células pueden administrarse mediante inyección o infusión. En algunas formas de realización, las células se administran encapsuladas dentro de un dispositivo implantable. En algunas formas de realización de la invención, las células se administran implantando un dispositivo que comprende las células.

Según otro aspecto, la invención proporciona una fracción celular soluble, lisado, matriz extracelular o

medio acondicionado preparado a partir de células obtenidas de tejido de cordón umbilical humano para su uso en el tratamiento de un paciente con lesión o insuficiencia renal aguda o enfermedad renal crónica, en el que el tejido de cordón umbilical está sustancialmente libre de sangre, y en el que las células son capaces de autorrenovarse y desarrollarse en cultivo y tienen el potencial de diferenciarse; necesitan L-valina para crecer; son capaces de crecer en atmósferas que contienen oxígeno del 5% al 20%; no producen CD117 ni HLA-DR; expresan alfa-actina de músculo liso; y expresan, en comparación con una célula madre mesenquimal, célula de médula ósea de cresta iliaca o fibroblasto humano mayores niveles de receptor 1 de lipoproteínas de baja densidad oxidadas, interleucina 8 o reticulón 1.

Según otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento de un paciente con lesión o insuficiencia renal aguda o enfermedad renal crónica, comprendiendo la composición un vehículo farmacéuticamente aceptable y células obtenidas de tejido de cordón umbilical humano, en el que el tejido de cordón umbilical está sustancialmente libre de sangre, y en el que las células son capaces de autorrenovarse y desarrollarse en cultivo y tienen el potencial de diferenciarse; necesitan L-valina para crecer; son capaces de crecer en atmósferas que contienen oxígeno del 5% al 20%; no producen CD117 ni HLA-DR; expresan alfa-actina de músculo liso; y expresan, en comparación con una célula madre mesenquimal, célula de médula ósea de cresta iliaca o fibroblasto humano mayores niveles de receptor 1 de lipoproteínas de baja densidad oxidadas, interleucina 8 o reticulón 1. En algunas formas de realización, el daño al riñón puede estar originado por la edad, un traumatismo, la exposición a toxinas, la exposición a fármacos, la exposición a radiación, la oxidación, la deposición de inmunocomplejos o el rechazo de trasplante. En algunas formas de realización, las células derivadas de tejido de cordón umbilical son inducidas *in vitro* para que se diferencien a células del linaje renal antes de la formulación de la composición. En algunas formas de realización, las células derivadas de tejido de cordón umbilical están modificadas por ingeniería genética para que expresen un producto génico que promueva la reparación y/o regeneración del tejido renal. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica incluye al menos otro tipo de célula. El al menos otro tipo de célula puede ser, pero no está limitado a, una célula epitelial del túbulo proximal, célula epitelial del asa de Henle, célula del túbulo distal, célula del conducto colector, célula parietal glomerular, podocito glomerular, célula mesangial, célula del endotelio vascular, célula intersticial u otra célula madre multipotencial o pluripotencial. En algunas formas de realización preferentes, la composición farmacéutica incluye adicionalmente al menos un agente. En algunas formas de realización preferentes, la composición farmacéutica se formula para la administración mediante inyección o infusión. En algunas formas de realización preferentes de la composición farmacéutica de la invención, las células derivadas de tejido de cordón umbilical están encapsuladas dentro de un dispositivo implantable. En algunas formas de realización de la composición farmacéutica de la invención, las células se siembran en una matriz.

Según otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento de un paciente con lesión o insuficiencia renal aguda o enfermedad renal crónica, que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un lisado, matriz extracelular o medio acondicionado preparado a partir de células obtenidas de tejido de cordón umbilical humano, en el que el tejido de cordón umbilical está sustancialmente libre de sangre, y en el que las células son capaces de autorrenovarse y desarrollarse en cultivo y tienen el potencial de diferenciarse; necesitan L-valina para crecer; son capaces de crecer en atmósferas que contienen oxígeno del 5% al 20%; no producen CD117 ni HLA-DR; expresan alfa-actina de músculo liso; y expresan, en comparación con una célula madre mesenquimal, célula de médula ósea de cresta iliaca o fibroblasto humano mayores niveles de receptor 1 de lipoproteínas de baja densidad oxidadas, interleucina 8 o reticulón 1.

Según otro aspecto, la invención proporciona kits para su uso en el tratamiento de un paciente con lesión o insuficiencia renal aguda o enfermedad renal crónica, que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable, células obtenidas de tejido de cordón umbilical humano en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad o lesión, en el que el tejido de cordón umbilical está sustancialmente libre de sangre, y en el que las células son capaces de autorrenovarse y desarrollarse en cultivo y tienen el potencial de diferenciarse; necesitan L-valina para crecer; son capaces de crecer en atmósferas que contienen oxígeno del 5% al 20%; no producen CD117 ni HLA-DR; expresan alfa-actina de músculo liso; y expresan, en comparación con una célula madre mesenquimal, célula de médula ósea de cresta iliaca o fibroblasto humano mayores niveles de receptor 1 de lipoproteínas de baja densidad oxidadas, interleucina 8 o reticulón 1, y las instrucciones para utilizar el kit en un método para tratar a un paciente con lesión o insuficiencia renal aguda o enfermedad renal crónica. En algunas formas de realización, el kit incluye al menos un reactivo para e instrucciones para cultivar las células. En algunas formas de realización, el kit incluye una población de al menos otro tipo de célula. En algunas formas de realización, el kit incluye al menos un agente.

La presente invención también proporcionan kits para su uso en el tratamiento de un paciente con lesión o insuficiencia renal aguda o enfermedad renal crónica, que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable, un lisado, una matriz extracelular o un medio acondicionado preparado a partir de células derivadas de tejido de cordón umbilical obtenidas de tejido de cordón umbilical humano, en el que el tejido de cordón umbilical está sustancialmente libre de sangre, y en el que las células son capaces de autorrenovarse y desarrollarse en cultivo y tienen el potencial de diferenciarse; necesitan L-valina para crecer; son capaces de crecer en atmósferas que contienen oxígeno del 5% al 20%; no producen CD117 ni HLA-DR; expresan alfa-actina de músculo liso; y expresan, en comparación con una célula madre mesenquimal, célula de médula ósea de cresta iliaca o fibroblasto humano mayores niveles de receptor 1 de lipoproteínas de baja densidad oxidadas, interleucina 8 o reticulón 1, y las

instrucciones para utilizar los componentes del kit en un método para tratar a un paciente con lesión o insuficiencia renal aguda o enfermedad renal crónica.

5 Las anteriores y otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción más concreta de las formas de realización preferentes de la invención, como se ilustra en los dibujos adjuntos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

10 La figura 1 muestra la secuencia temporal para la ejecución del daño renal y la experimentación de la reparación. Las flechas en negrita indican el momento en el que se inyectó el cisplatino, las células o el vehículo HBSS, así como el momento en el que se produjo la extracción de sangre y la necropsia.

15 La Figura 2 muestra la tasa de supervivencia de los animales después de la inducción del daño renal y el trasplante con células derivadas de tejido de cordón umbilical. El número del grupo de tratamiento se muestra en el eje x.

La Figura 3 muestra las mediciones de BUN en ratones. Las muestras de suero se recogieron los días 1, 3, 5 y 7 después del trasplante de las células y se midió el BUN. Las barras de error representan el EEM.

La Figura 4 muestra los resultados de las mediciones de creatinina sérica. Las barras de error representan el error estándar de la media. (*) P <0,03.

20 La Figura 5 muestra imágenes histológicas representativas. Las secciones histológicas se puntuaron para el grado de degeneración tubular. A) Grupo de tratamiento con vehículo. B) Grupo de tratamiento con hUTC (dosis celular 0.2e6). Túbulo representativo con degeneración significativa.

La Figura 6 muestra el análisis de BUN en ratas. Las barras de error representan el error estándar de la media. ** valor de p <0,005. * valor de p <0,03.

25 La Figura 7 muestra el análisis de SCr en ratas. Las barras de error representan el error estándar de la media. ** valor de p <0,005. * valor de p <0,03.

La Figura 8 muestra el análisis de CrCl en ratas. Las barras de error representan el error estándar de la media. * valor de p <0,03.

30 DESCRIPCIÓN DETALLADA

A lo largo de toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones se utilizan diversos términos y expresiones relacionadas con los métodos y otros aspectos de la presente invención. Se debe dar a tales términos y expresiones su significado normal en la técnica a menos que se indique lo contrario. Otros términos y expresiones definidos específicamente deben interpretarse de manera coherente con la definición proporcionada en el presente documento.

40 Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "la" y "el" incluyen los referentes plurales a menos que el contenido dicte claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una combinación de dos o más células, y similar.

45 El término "aproximadamente" tal como se utiliza en el presente documento para referirse a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal, y similares, pretende abarcar variaciones de $\pm 20\%$ ó $\pm 10\%$, más preferentemente $\pm 5\%$, incluso más preferentemente $\pm 1\%$ y aún más preferentemente $\pm 0,1\%$ del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para llevar a cabo los métodos descritos.

"Derivada/s" se utiliza para indicar que las células se han obtenido a partir de su fuente biológica y se han cultivado, multiplicado en cultivo, inmortalizado o manipulado de otra manera *in vitro*.

50 "Aislado" significa modificado "por la mano del hombre" a partir del estado natural. Si una molécula o composición se da en la naturaleza, se ha "aislado" si se ha cambiado o separado de su entorno original, o ambos.

55 El término "expresa", "expresado/a" o "expresión" de una molécula de ácido nucleico o gen se refiere a la biosíntesis de un producto génico, por ejemplo, la biosíntesis de un polipéptido.

"Factores tróficos" son sustancias que promueven la supervivencia, el crecimiento, la diferenciación, la proliferación y/o la maduración de una célula, o estimulan el aumento de la actividad biológica de una célula.

60 "Daño" se refiere a cualquier daño físico, lesión, degeneración o traumatismo en el riñón.

"Patología" se refiere a cualquier indicio estructural o funcional de una desviación del estado normal de una célula, tejido, órgano o sistema, según se mide mediante cualquier medio adecuado en la técnica.

65 Una "enfermedad" es cualquier desviación o deterioro de la salud, el estado o el funcionamiento de una célula, tejido, órgano, sistema u organismo en su conjunto, según se mide mediante cualquier medio adecuado en la técnica.

Una "enfermedad primaria" del riñón es cualquier enfermedad que se origina en, y ataca de manera exclusiva, ataca sustancialmente de manera exclusiva o ataca sustancialmente al riñón.

5 Una "enfermedad secundaria" del riñón es cualquier enfermedad que no es una enfermedad primaria del riñón. A modo de ejemplo y no de limitación, tales enfermedades pueden atacar de manera no exclusiva, atacar casualmente, extenderse a, o afectar de otra manera al riñón. Esta expresión abarca enfermedades del riñón que derivan de infecciones o enfermedades de otros órganos o sistemas del cuerpo, o enfermedades sistémicas que inducen, sostienen o potencian la patología de los riñones.

10 "Renal" significa de o relacionado con uno o más riñones.

15 "Tratar" o "tratamiento" se refiere a cualquier éxito o indicio de éxito en la atenuación o mejora de la enfermedad, daño o afección, incluido cualquier parámetro objetivo o subjetivo, tal como la reducción, remisión, disminución de los síntomas o hacer la enfermedad, el daño o la afección más tolerable para el paciente, reducir el ritmo de degeneración o deterioro, hacer el punto final de la degeneración menos debilitante, mejorar el bienestar físico o mental de un sujeto o prolongar la duración de la supervivencia. El tratamiento o la mejora de los síntomas pueden basarse en parámetros objetivos o subjetivos, incluidos los resultados de un examen físico, examen neurológico y/o evaluaciones psiquiátricas.

20 "Cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se utilizan indistintamente en el presente documento, y se refieren a una cantidad de un compuesto, material o composición, tal como se describe en el presente documento, eficaz para conseguir un resultado biológico concreto, tal como, pero no limitado a, los resultados biológicos divulgados, descritos o ejemplificados el presente documento. Tales resultados pueden incluir pero no se limitan al tratamiento del daño o enfermedad renal en un sujeto, según se determina mediante cualquier medio adecuado en la técnica.

25 "Farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas propiedades y/o sustancias que son aceptables para el paciente desde un punto de vista farmacológico/toxicológico y para el químico farmacéutico fabricante desde un punto de vista físico/químico con respecto a la composición, la formulación, la estabilidad, la aceptación del paciente y la biodisponibilidad. "Vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un medio que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente o ingredientes activos y no es tóxico para el hospedador al que se administra.

35 Se ha descubierto según la presente invención que los riñones dañados pueden repararse y regenerarse mediante la administración de células derivadas de tejido de cordón umbilical, invirtiendo así la insuficiencia renal aguda y potenciando la supervivencia de los animales que han sufrido una lesión en los riñones. También se ha descubierto adicionalmente que la administración de tales células a los animales normalizaban los niveles de creatinina sérica y nitrógeno ureico en sangre en los animales lesionados. Por consiguiente, la invención presenta células obtenidas de tejido de cordón umbilical humano para su uso en métodos de tratamiento de un paciente con lesión o insuficiencia renal aguda o enfermedad renal crónica. En general, los métodos comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de células derivadas de tejido de cordón umbilical de manera que se produzca la reparación y/o regeneración del riñón o riñones afectados.

40 Puede recuperarse un cordón umbilical de mamífero después o poco después de terminado un embarazo a término o prematuro, por ejemplo, tras la expulsión después del nacimiento o la extirpación quirúrgica después de una cesárea. La sangre y los residuos se eliminan del tejido de cordón umbilical antes del aislamiento de las células, por ejemplo, por lavado con cualquier medio o tampón adecuado.

45 Las células pueden aislarse del tejido de cordón umbilical mediante fuerza mecánica o por digestión enzimática. Las enzimas preferentes son metaloproteasas, proteasas neutras y proteasas mucolíticas. Por ejemplo, pueden utilizarse diversas combinaciones de colagenasa, dispasa e hialuronidasa para disociar las células del tejido de cordón umbilical. El experto en la técnica comprenderá que muchos de tales tratamientos enzimáticos son conocidos en la técnica para el aislamiento de células a partir de diversas fuentes de tejido. Por ejemplo, la serie de combinaciones de enzimas LIBERASE® Blendzyme (Roche) es adecuada para su uso en los presentes métodos. Se conocen otras fuentes de enzimas, y el experto en la técnica también pueden obtener tales enzimas directamente de sus fuentes naturales. El experto en la técnica también está preparado para evaluar enzimas o combinaciones de enzimas nuevas o adicionales, para determinar su utilidad en el aislamiento de las células de la invención. Los tratamientos enzimáticos preferentes son de 0,5, 1, 1,5 ó 2 horas de duración o más.

50 Las células aisladas pueden utilizarse para iniciar cultivos celulares. Las células aisladas se transfieren a recipientes de cultivo de tejidos estériles no recubiertos o recubiertos con matriz extracelular o ligandos tales como laminina, colágeno (natural, desnaturalizado o reticulado), gelatina, fibronectina y otras proteínas de la matriz extracelular. Las células derivadas de tejido de cordón umbilical se cultivan en cualquier medio de cultivo capaz de mantener el crecimiento de las células tales como, pero no limitados a, DMEM (con alto o bajo contenido en glucosa), DMEM avanzado, DMEM/MCDB 201, medio basal de Eagle, medio F10 de Ham (F10), medio F-12 de Ham (F12), medio de Hayflick, medio de Dulbecco modificado por Iscove, medio de crecimiento para células madre

mesenquimales (MSCGM), DMEM/F12, RPMI 1640 y CELL-GRO-FREE. El medio de cultivo puede complementarse con uno o más componentes incluidos, por ejemplo, suero bovino fetal, preferentemente aproximadamente un 2%-15% (v/v); suero equino; suero humano; suero de ternera fetal; beta-mercaptoetanol, preferentemente aproximadamente un 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-1 de crecimiento insulinoide (IGF-1), factor inhibidor de leucocitos (LIF) y la eritropoyetina; aminoácidos, incluida L-valina; y uno o más antibióticos y/o agentes antimicóticos para controlar la contaminación microbiana, tal como, por ejemplo, penicilina G, sulfato de estreptomina, anfotericina B, gentamicina y nistatina, ya sea en solitario o en combinación.

Las células se siembran en recipientes de cultivo a una densidad que permita el crecimiento celular. En una forma de realización, las células se cultivan entre aproximadamente un 0 por ciento y aproximadamente un 5 por ciento en volumen de CO₂ en el aire. En algunas formas de realización, las células se cultivaron entre aproximadamente un 2 por ciento y aproximadamente un 25 por ciento de O₂ en el aire, preferentemente entre aproximadamente un 5 por ciento y aproximadamente un 20 por ciento de O₂ en el aire. Las células se cultivan preferentemente entre aproximadamente 25°C y aproximadamente 40°C y más preferentemente se cultivan a 37°C. El medio en el recipiente de cultivo puede ser estático o agitado, por ejemplo, utilizando un biorreactor. Las células derivadas de tejido de cordón umbilical se cultivan preferentemente en condiciones de bajo estrés oxidativo (por ejemplo, con adición de glutatión, vitamina C, catalasa, vitamina E, N-acetilcisteína), es decir, nulo o mínimo daño por radicales libres a las células cultivadas.

Las células derivadas de tejido de cordón umbilical pueden someterse a pases o trasladarse a un recipiente de cultivo separado que contenga medio de nueva aportación del mismo o diferente tipo que el utilizado inicialmente, en el que la población de células puede multiplicarse por mitosis. Las células de la invención pueden utilizarse 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 entre aproximadamente 4 y aproximadamente 12 veces, y preferentemente se someten a pases 10 u 11 veces. Puede realizarse la clonación y/o subclonación para confirmar que se ha aislado una población clonal de células.

Los diferentes tipos celulares presentes en el tejido de cordón umbilical pueden fraccionarse en subpoblaciones. Esto puede lograrse utilizando técnicas convencionales para la separación celular, incluidas, pero no limitadas a, tratamiento enzimático; clonación y selección de tipos celulares específicos, por ejemplo, pero sin limitarse a la selección basada en marcadores morfológicos y/o bioquímicos; crecimiento selectivo de las células deseadas (selección positiva), destrucción selectiva de las células no deseadas (selección negativa); separación basada en la aglutinabilidad celular diferencial en la población mixta tal 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 contracorriente); separación a gravedad unitaria; distribución contracorriente; electroforesis; clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS); y similares.

Los ejemplos de células aisladas a partir de tejido de cordón umbilical se depositaron en la Colección Americana de Cultivos Tipo el 10 de junio de 2004, y se les asignaron los números de registro de la ATCC de la siguiente manera: (1) al nombre de cepa UMB 022803 (P7) se le asignó el N° de registro PTA-6067; y (2) al nombre de cepa UMB 022803 (P17) se le asignó el N° de registro PTA-6068.

Las células derivadas de tejido de cordón umbilical pueden caracterizarse, por ejemplo, por las características de crecimiento (por ejemplo, la capacidad de duplicación de la población, el tiempo de duplicación, los pases hasta la senescencia), el análisis del cariotipo (por ejemplo, cariotipo normal; linaje materno o neonatal), la citometría de flujo (por ejemplo, análisis FACS), la inmunohistoquímica y/o la inmunocitoquímica (por ejemplo, para la detección de epítomos), los perfiles de expresión génica (por ejemplo, matrices génicas; reacción en cadena de la polimerasa (por ejemplo, PCR con transcriptasa inversa, PCR en tiempo real y PCR convencional)), matrices de proteínas, la secreción de proteínas (por ejemplo, mediante ensayo de coagulación de plasma o análisis de medio acondicionado con PDC, por ejemplo, mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)), reacción linfocitaria mixta (por ejemplo, como medida de la estimulación de las PBMC) y/u otros métodos conocidos en la técnica.

En diversos aspectos, las células derivadas de tejido de cordón umbilical tienen una o más de las siguientes características de crecimiento: necesitan L-valina para crecer en cultivo; son capaces de crecer en atmósferas que contienen oxígeno de aproximadamente un 5% a al menos aproximadamente un 20%; tienen el potencial de al menos aproximadamente 40 duplicaciones en cultivo antes de alcanzar la senescencia; y se fijan y se multiplican en un recipiente de cultivo de tejido recubierto o no recubierto, en el que el recipiente de cultivo de tejido recubierto comprende un recubrimiento de gelatina, laminina, colágeno, poliornitina, vitronectina o fibronectina.

En determinadas formas de realización, las células tienen un cariotipo normal, que se mantiene a medida que las células se someten a pases. La determinación del cariotipo es particularmente útil para identificar y distinguir las células neonatales de las maternas derivadas de la placenta. Los métodos para la determinación del cariotipo

están disponibles y son conocidos por los expertos en la materia.

5 En otras formas de realización, las células pueden caracterizarse por la producción de determinadas proteínas, incluida la producción de al menos uno de entre factor tisular, vimentina y alfa-actina de músculo liso; y la producción de al menos uno de los marcadores de superficie celular CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, PD-L2 y HLA-A,B,C, según se detecta mediante citometría de flujo. En otras formas de realización, las células pueden caracterizarse por la falta de producción de al menos uno de los marcadores de superficie celular CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G, y HLA-DR, HLA-DP y/o HLA-DQ, según se detecta mediante cualquier medio adecuado tal como citometría de flujo. Resultan particularmente preferentes las células que producen al menos dos de entre factor tisular, vimentina y alfa-actina de músculo liso. Resultan más preferentes las células que producen las tres proteínas factor tisular, vimentina y alfa-actina de músculo liso.

15 En otras formas de realización, las células tienen, en comparación con una célula humana que es una célula madre mesenquimal, una célula de médula ósea de cresta ilíaca o un fibroblasto, mayor expresión de un gen que codifica al menos uno de entre interleucina 8; reticulón 1; ligando 1 de quimiocina (motivo C-X-C) (actividad estimuladora del crecimiento de melanomas, alfa); ligando 6 de quimiocina (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica para granulocitos); ligando 3 de quimiocina (motivo C-X-C); factor de necrosis tumoral, proteína 3 inducida por alfa; miembro 2 de la superfamilia de lectinas tipo C; tumor de Wilms 1; miembro A2 de la familia de aldehído deshidrogenasa 1; renina; receptor 1 de lipoproteínas de baja densidad oxidadas; clon IMAGE:4179671 de *Homo sapiens*; proteína quinasa C zeta; proteína hipotética DKFZp564F013; con expresión disminuida en el cáncer de ovario 1; y gen del clon DKFZp547k1113 de *Homo sapiens*.

25 En otras formas de realización, las células tienen, en comparación con una célula humana que es una célula madre mesenquimal, una célula de médula ósea de cresta ilíaca o un fibroblasto, menor expresión de un gen que codifica al menos uno de entre: caja homeótica de la baja estatura 2; proteína 2 de choque térmico de 27 kDa; ligando 12 de quimiocina (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células del estroma); elastina (estenosis aórtica supraválvular, síndrome de Williams-Beuren); ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); caja homeótica de mesénquima 2 (caja homeótica específica de la detención del crecimiento); homólogo 1 de caja la homeótica de "sine oculis" (*Drosophila*); cristalino, alfa B; activador de la morfogénesis asociado a "disheveled" 2; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralina 1; tetranectina (proteína de unión a plasminógeno); de homología con src tres (SH3) y dominio rico en cisteína; colesterol 25 hidroxilasa; factor de transcripción 3 relacionado con enanismo; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de procolágeno C-endopeptidasa; homólogo 7 de "frizzled" (*Drosophila*); gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa I; tenascina C (hexabraquion); proteína 5 de la caja homeótica de "iroquois"; hepaestina; integrina, beta 8; glicoproteína 2 de las vesículas sinápticas; neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; proteína 2 de unión al factor de crecimiento insulinoide, de 36 kDa; ADNc FLJ12280 fis de *Homo sapiens*, clon MAMMA 1001744; factor 1 similar a receptor de citocinas; canal de potasio activado por calcio de conductancia intermedia/baja, subfamilia N, miembro 4; integrina, beta 7; coactivador de la transcripción con motivo de unión a PDZ (TAZ); homólogo 2 de la caja homeótica de "sine oculis" (*Drosophila*); proteína KIAA1034; proteína 5 de membrana asociada a vesículas (miobrevina); proteína 1 de la matriz extracelular de tipo fibulina que contienen EGF; de respuesta de crecimiento precoz 3; caja homeótica 5 de "distal-less"; proteína hipotética FLJ20373; familia 1 de aldo-ceto reductasa, miembro C3 (3-alfa hidroxisteroide deshidrogenasa, tipo II); biglicano; coactivador de la transcripción con motivo de unión a PDZ (TAZ); fibronectina 1; proencefalina; integrina, similar a beta 1 (con dominios de repetición de tipo EGF); clon EUROIMAGE 1968422 de ADNc de inserto de longitud completa de ARNm de *Homo sapiens*; EphA3; proteína KIAA0367; receptor C del péptido natriurético/guanilato ciclasa C (receptor C del péptido atrial natriurético); proteína hipotética FLJ14054; ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222); similar a proteína 3 de interacción con BCL2/adenovirus E1B 19kDa; proteína 1 de unión a AE; y polipéptido 1 de la subunidad VIIa de la citocromo c oxidasa (músculo).

50 En algunas formas de realización, las células pueden caracterizarse por la secreción de al menos uno de entre MCP-1, IL-6, IL-8, GCP-2, HGF, KGF, FGF, HB-EGF, BDNF, TPO, MIP1b, 1309, MOC, RANTES y TIMP1. En algunas formas de realización, las células pueden caracterizarse por la falta de secreción de al menos uno de entre TGF-beta2, ANG2, PDGF-bb, MIP1a y VEGF, según se detecta mediante ELISA.

55 En las formas de realización preferentes, la célula comprende dos o más de las características de crecimiento, producción de marcadores proteicos/de superficie, expresión génica o secreción de sustancias anteriormente indicadas. Resultan más preferentes las células que comprenden, tres, cuatro o cinco o más de las características. Resultan aún más preferentes las células que comprenden seis, siete u ocho o más de las características. Resultan aún más preferentes las células que comprenden todas las características anteriormente indicadas.

60 Entre las células que resultan preferentes para su uso con los diversos aspectos de la invención, se encuentran las células con las características descritas anteriormente y más concretamente aquellas en las que las células tienen cariotipos normales y mantienen cariotipos normales durante los pases, y además en las que las células expresan cada uno de los marcadores CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, en las que las células producen proteínas inmunológicamente detectables que corresponden a los marcadores indicados.

65

Resultan aún más preferentes las células que además de lo anteriormente indicado no producen proteínas correspondientes a cualquiera de los marcadores CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 o HLA-DR,DP,DQ, según se detecta mediante cualquier medio adecuado en la técnica, tal como la citometría de flujo. Las células de la invención no expresan CD117 ni HLA-DR.

5 En aspectos muy preferentes, los métodos comprenden la administración de células obtenidas o aisladas a partir de tejido de cordón umbilical humano a un sujeto que necesita tratamiento para una lesión o insuficiencia renal aguda o enfermedad renal crónica, en los que las células son capaces de autorrenovarse y desarrollarse en cultivo, necesitan L-valina para crecer, son capaces de crecer en atmósferas que contienen oxígeno del 5% al 20%, no producen CD117 ni HLA-DR, expresan alfa-actina de músculo liso, y expresan, en comparación con una célula madre mesenquimal, célula de médula ósea de cresta ilíaca o fibroblasto humano mayores niveles de receptor 1 de lipoproteínas de baja densidad oxidadas, interleucina 8 o reticulón 1. Las células aisladas a partir de tejido de cordón umbilical humano pueden multiplicarse en cultivo antes de su administración. En algunas formas de realización, las células obtenidas a partir de tejido de cordón umbilical humano tienen el potencial de diferenciarse a células de al menos un fenotipo renal. Puede utilizarse la expresión de Pax-2, un factor de transcripción expresado por las células progenitoras epiteliales renales, para identificar la diferenciación de las células derivadas de tejido de cordón umbilical a un fenotipo renal o linaje de células renales. La diferenciación a células renales de las células derivadas de tejido de cordón umbilical también se demuestra por tubulogénesis y morfogénesis de la ramificación en geles de colágeno tridimensionales.

20 Determinadas células con el potencial de diferenciarse en líneas que conducen a diversos fenotipos son inestables y por lo tanto pueden diferenciarse espontáneamente. Actualmente resultan preferentes para su uso con la invención células que no se diferencien espontáneamente, por ejemplo, en líneas celulares de riñón. Las células preferentes, cuando se cultivan en medio de crecimiento, son sustancialmente estables con respecto a los marcadores celulares producidos en su superficie, y con respecto al patrón de expresión de diversos genes, por ejemplo como se determina utilizando la determinación de perfiles de expresión génica, por ejemplo, mediante el uso matrices polipeptídicas o de ácidos nucleicos. Las células permanecen sustancialmente constantes, por ejemplo en sus características en cuanto a los marcadores de superficie durante los pases, a través de múltiples duplicaciones de la población.

30 En los métodos de la invención, las células derivadas de tejido de cordón umbilical pueden administrarse junto con otras células terapéuticas y/o con un agente biológicamente activo, tal como antitrombogénicos, agentes antiapoptóticos, antiinflamatorios, inmunosupresores (por ejemplo, ciclosporina, rapamicina), antioxidantes u otros agentes utilizados habitualmente en la técnica para tratar el daño o enfermedad renal tal como eprodisato y triptolida. Las células derivadas de tejido de cordón umbilical pueden administrarse junto con un inhibidor de HMG-CoA reductasa, incluido, pero no limitado a simvastatina, pravastatina, lovastatina, fluvastatina, cerivastatina y atorvastatina. Las células derivadas de tejido de cordón umbilical pueden administrarse en secuencia con o coadministrarse con otras células o agente. También pueden administrarse a los pacientes, según resulte apropiado, lisados, fracciones celulares solubles, fracciones celulares enriquecidas en membranas, medios de cultivo celular (por ejemplo, medios acondicionados) o matriz extracelular derivada de células derivadas de tejido de cordón umbilical, incluida la coadministración con las propias células derivadas de tejido de cordón umbilical, y células o agentes adicionales. El agente particular elegido puede ser a criterio del profesional médico que dirige el tratamiento del paciente, y puede variar según la afección o las necesidades concretas del paciente. El agente elegido puede utilizarse para diversos fines, tales como, pero no limitados a, facilitar la administración de las células, mejorar la reparación y/o regeneración del riñón, mejorar la salud general del paciente, reducir el dolor, reducir o prevenir el rechazo de las células trasplantadas, y similares.

45 La facilitación de la reparación y regeneración de tejido renal puede ser por medio de factores tróficos secretados por las células derivadas de tejido de cordón umbilical. Por ejemplo, la eficacia renoprotectora puede ser conferida a través de mecanismos mediados por factores tróficos o paracrinós de células derivadas de tejido de cordón umbilical. Tales factores incluyen, por ejemplo, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), proteína-7 morfogenética ósea (BMP-7), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), metaloproteinasa de matriz 2 (MMP-2) y factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF). La administración de las células derivadas de tejido de cordón umbilical puede proporcionar una liberación continua de uno o más factores renoprotectores. En lugar de, o además de, la administración de uno o más factores renoprotectores, puede utilizarse el soporte trófico o la liberación de factores renoprotectores por las células derivadas de tejido de cordón umbilical.

50 Los métodos son útiles para el tratamiento de la lesión o insuficiencia renal aguda o la enfermedad renal crónica que da como resultado la morbilidad o una menor esperanza de vida. Algunos ejemplos no limitativos de daños que pueden repararse y revertirse mediante la invención incluyen la extirpación quirúrgica de cualquier parte (o la totalidad) del riñón, el daño de origen medicamentoso, el daño inducido por toxinas, el daño inducido por radiación, el daño inducido por la exposición ambiental, el daño por ondas sonoras, el daño térmico, el daño hipóxico, el daño por oxidación, el daño viral, el daño relacionado con la edad o la senescencia, el daño inducido por inflamación, el daño inducido por células inmunitarias, por ejemplo, rechazo de trasplante, el daño inducido por inmunocomplejos, y similares. Cinco categorías principales de fármacos asociados con la patología renal son fármacos que se dirigen contra procesos hemodinámicos, metabólicos, fibróticos, inflamatorios o

inmunomoduladores. Las células derivadas de tejido de cordón umbilical pueden ejercer su efecto al actuar sobre uno o más de estos procesos fisiológicos.

5 Las células pueden administrarse como composición celular farmacéutica/terapéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y células derivadas de tejido de cordón umbilical tal como se describe y ejemplifica en el presente documento. Las composiciones de células terapéuticas pueden comprender células derivadas de tejido de cordón umbilical inducidas a diferenciarse en un linaje o vía celular renal. Las composiciones de células terapéuticas pueden comprender células o productos celulares que estimulen a las células en el riñón del paciente para que se dividan, diferencien, o ambos. Resulta preferente que la composición de células terapéuticas induzca, facilite o mantenga la reparación y/o regeneración de los riñones en el paciente al que se administran.

15 Las células pueden administrarse al paciente mediante inyección. Por ejemplo, las células pueden inyectarse directamente en uno o ambos riñones del paciente, o pueden inyectarse en la superficie del riñón, en una zona adyacente o incluso a una zona más remota con la posterior migración a los riñones del paciente. En algunos aspectos preferentes, las células pueden migrar de manera dirigida a la zona enferma o dañada. Resultan especialmente preferentes las células que pueden inyectarse por vía intravenosa y ubicarse apropiadamente en el sitio de acción deseado, por ejemplo, las células renales o sus progenitoras preferentemente son capaces de ubicarse en y migrar de manera dirigida al riñón o a sus estructuras o subestructuras.

20 Las células también pueden administrarse en forma de dispositivo, tal como un complejo de matriz-célula. Los materiales del dispositivo incluyen, pero no se limitan a, materiales biorreabsorbibles tales como colágenos, 35/65 Poli(epsilon-caprolactona)(PCL)/Poli(ácido glicólico) (PGA), constructos bioabsorbibles Panacryl™, poliglactina 910 Vicryl™ y péptidos de autoensamblaje y materiales no reabsorbibles tales como fluoropolímeros (por ejemplo, fluoropolímeros de Teflon®), plástico y metal. Las matrices incluyen estructuras reticulares, estructuras de autoensamblaje, matrices biodegradables biocompatibles, y similares, bioabsorbibles o no, líquidas, en gel o sólidas. Tales matrices son conocidas en la técnica de la reparación quirúrgica, la ingeniería de tejidos, la cicatrización de heridas y el tratamiento con células terapéuticas. Preferentemente, las matrices se tratan previamente con las células terapéuticas. Más preferentemente, las matrices están pobladas con células en estrecha asociación con la matriz o sus espacios. Las células pueden adherirse a la matriz o pueden estar atrapadas o contenidas en los espacios de la matriz. Lo más preferente son complejos de matriz-célula en los que las células estén creciendo en estrecha asociación con la matriz y cuando se utilizan terapéuticamente, se estimula y apoya el crecimiento, la reparación y/o la regeneración de las propias células renales del paciente, y se estimula o apoya de forma similar la angiogénesis apropiada. Las composiciones de matriz-célula pueden introducirse en el cuerpo de un paciente de cualquier modo conocido en la técnica, incluida, pero no limitada a la implantación, la inyección, la fijación quirúrgica, el trasplante con otro tejido, y similares. En algunas formas de realización, las matrices se forman *in vivo*, o incluso más preferentemente *in situ*, por ejemplo pueden utilizarse geles polimerizables *in situ* según la invención. Los ejemplos de tales geles son conocidos en la técnica.

40 Las células de la invención también pueden sembrarse en tales matrices tridimensionales, tal como matrices biodegradables, e implantarse *in vivo*, donde las células sembradas pueden proliferar sobre o en el armazón, o ayudar a establecer el tejido de reemplazo *in vivo* con o sin la cooperación de otras células. El crecimiento de las células derivadas de tejido de cordón umbilical en el armazón tridimensional da preferentemente como resultado la formación de un tejido tridimensional, o los cimientos del mismo, que puede utilizarse *in vivo*, por ejemplo para reparar y/o regenerar el tejido dañado o enfermo. Por ejemplo, las matrices biodegradables tridimensionales pueden utilizarse para formar estructuras tubulares, por ejemplo para su uso en la reparación de los vasos sanguíneos renales, o diversos otros aspectos del sistema renal o estructuras renales.

50 Las células pueden sembrarse en una matriz o armazón tridimensional, tal como una matriz biodegradable, una espuma o hidrogel, y administrarse como corresponda. El armazón puede configurarse en diversas formas tal como sustancialmente plana, sustancialmente cilíndrica o tubular, o puede carecer completamente de forma según se necesite o se desee para la estructura correctiva en cuestión. Pueden colocarse dos o más armazones sustancialmente planos uno encima de otro y fijarse entre sí según sea necesario para generar un armazón multicapa.

55 En algunos aspectos, las células crecen en la estructura tridimensional, y en algunos aspectos, las células sólo sobreviven, o incluso mueren, aunque al hacerlo estimulan o promueven la reparación y la regeneración del tejido renal, por ejemplo, y preferentemente facilitan o mantienen la vascularización.

60 En tales armazones tridimensionales, las células pueden coadministrarse con otros tipos de células renales u progenitoras de otro tipo de tejido blando, incluidas las células madre. Cuando se cultivan en este sistema tridimensional, las células proliferantes maduran y se separan apropiadamente para formar componentes de tejidos adultos análogos a los equivalentes que se encuentran naturalmente *in vivo*.

65 Las matrices descritas y ejemplificadas en el presente documento pueden diseñarse de manera que la estructura de la matriz dé soporte a las células derivadas de tejido de cordón umbilical sin degradación posterior, dé soporte a las células desde el momento de la siembra hasta que el trasplante de tejido es remodelado por el tejido

del hospedador, o permita a las células sembradas que se fijen a, proliferen y se conviertan en una estructura tisular con la suficiente integridad mecánica para mantenerse a sí misma *in vitro*, momento en el cual la matriz se degrada.

5 Las matrices, matrices biodegradables, espumas y sistemas de autoensamblaje contemplados para su uso en el presente documento pueden implantarse en combinación con una cualquiera o varias células, factores de crecimiento, fármacos u otros componentes, tales como agentes bioactivos que promuevan la curación, la regeneración, la reparación o el crecimiento interno de tejido, o estimulen la vascularización o la innervación del mismo o potencien o mejoren de otra manera el resultado terapéutico o la práctica de la invención, además de las células de la invención. En un aspecto preferente, un dispositivo que comprende uno o más inhibidores de HMG-CoA reductasa se siembra con células derivadas de tejido de cordón umbilical. El inhibidor de HMG-CoA reductasa puede bombearse al dispositivo. Pueden incorporarse en el dispositivo uno o más inhibidores de HMG-CoA reductasa. En algunas formas de realización, se trata un dispositivo sembrado con las células de la invención con uno o más inhibidores de HMG-CoA reductasa. El dispositivo puede implantarse *in vivo*.

15 Las células pueden hacerse crecer libremente en cultivo, extraerse del cultivo e inocularse en un almacén tridimensional. La inoculación del almacén tridimensional con una concentración de células, por ejemplo, de aproximadamente 10^6 a 5×10^7 células por mililitro, da preferentemente como resultado el establecimiento del soporte tridimensional en períodos de tiempo relativamente más cortos. Además, en algunas aplicaciones puede ser preferente utilizar un mayor o menor número de células en función del resultado deseado.

20 En algunos aspectos, es útil para volver a crear en cultivo el microambiente celular que se encuentra *in vivo*, de manera que pueda variar el grado de crecimiento de las células antes de la implantación *in vivo* o de uso *in vitro*. Las células pueden inocularse en el almacén antes o después de la conformación de la forma deseada para la implantación, por ejemplo, cuerdas, tubos, filamentos, y similares. Después de la inoculación de las células sobre el almacén, el almacén se incuba preferentemente en un medio de crecimiento apropiado. Durante el período de incubación, las células inoculadas crecen y envuelven el almacén y pueden, por ejemplo, unir o unir parcialmente los espacios intersticiales en el mismo. Resulta preferente pero no necesario, cultivar las células hasta un grado apropiado que refleje la densidad celular *in vivo* del tejido renal que se está reparado o regenerado. En otras formas de realización, la presencia de las células, incluso en bajas cantidades en el almacén, estimula el crecimiento interno de las células endógenas sanas para facilitar la curación por ejemplo del tejido dañado o lesionado.

35 Los ejemplos de matrices, por ejemplo matrices biodegradables que pueden utilizarse para los aspectos de la invención incluyen mallas (tejidas, de punto, y más preferentemente no tejidas), espumas porosas o semiporosas, péptidos de autoensamblaje y similares. Las mallas no tejidas pueden formarse, por ejemplo, utilizando fibras compuestas por polímeros naturales o sintéticos. En una forma de realización preferente, se utilizan copolímeros absorbibles de los ácidos glicólico y láctico (PGA/PLA), que se venden con el nombre comercial VICRYL® (Ethicon, Inc., Somerville, NJ), para formar una malla. Las espumas, compuestas por ejemplo por copolímero de poli(epsilon-caprolactona)/poli(ácido glicólico) (PGA/PCL), formadas mediante procesos tales como criodesecación, o liofilización, como se analiza en la patente de EE.UU. N° 6.355.699, pueden hacer también de matrices biodegradables. Los geles también forman matrices adecuadas, tal como se utilizan en el presente documento. Los ejemplos incluyen geles polimerizables *in situ*, e hidrogeles, por ejemplo compuestos por péptidos de autoensamblaje. Estos materiales se utilizan frecuentemente como soportes para el crecimiento de tejido. Las redes degradables de formación *in situ* también son adecuadas para su uso en la invención (véanse, por ejemplo, Anseth, K.S. *et al.*, 2002, J. Controlled Release 78: 199-209; Wang, D. *et al.*, 2003, Biomaterials 24: 3969-3980, la publicación de patente de EE.UU. 2002/0022676 concedida a He *et al.*). Estos materiales se formulan como fluidos adecuados para inyección, y a continuación pueden introducirse mediante diversos medios (por ejemplo, cambio en la temperatura, pH, exposición a la luz) para que formen redes de hidrogel degradables *in situ* o *in vivo*.

50 El almacén puede ser un fieltro, que puede estar compuesto por un hilo multifilamento hecho de un material bioabsorbible, por ejemplo, mezclas o copolímeros de PCL, PGA, PLA, o ácido hialurónico. El hilo se convierte en un fieltro utilizando técnicas convencionales de procesamiento textil que consisten en prensado, corte, cardado y punzonado. Las células de la invención pueden sembrarse sobre matrices biodegradables de espuma que pueden ser estructuras compuestas. Además, el almacén tridimensional puede moldearse en una forma útil, tal como una estructura específica en o alrededor del riñón a reparar, reemplazar o aumentar.

55 El almacén puede tratarse antes de inocular las células de la invención a fin de potenciar la fijación de las células. Por ejemplo, antes de la inoculación con las células de la invención, podrían tratarse matrices de nailon con ácido acético 0,1 molar e incubarse en polilisina, PBS y/o colágeno para recubrir el nailon. Podría tratarse poliestireno de forma similar utilizando ácido sulfúrico.

60 Además, pueden modificarse las superficies externas del almacén tridimensional para mejorar la fijación o el crecimiento de las células y la diferenciación del tejido, tal como mediante recubrimiento con plasma del almacén o adición de una o más proteínas (por ejemplo, colágenos, fibras elásticas, fibras reticulares), glicoproteínas, glicosaminoglicanos (por ejemplo, sulfato de heparina, chondroitin-4-sulfato, chondroitin-6-sulfato, sulfato de dermatán, sulfato de queratina), una matriz celular y/u otros materiales tales como, pero no limitados a, gelatina, alginatos, agar, agarosa y gomas vegetales, entre otros.

65

La matriz biodegradable puede estar compuesta por o tratarse con materiales que la hagan no trombogénica. Estos tratamientos y materiales también pueden promover y mantener el crecimiento endotelial, la migración y la deposición de matriz extracelular. Los ejemplos de estos materiales y tratamientos incluyen, pero no se limitan a, materiales naturales tales como proteínas de la membrana basal, tal como laminina y colágeno tipo IV, materiales sintéticos tales como ePTFE, y siliconas de poliuretano urea segmentadas, tal como PURSPAN® (The Polymer Technology Group, Inc., Berkeley, CA). Estos materiales pueden tratarse adicionalmente para hacer la matriz biodegradable no trombogénica. Tales tratamientos incluyen antitrombóticos tales como la heparina, y tratamientos que modifican la carga superficial del material, tal como el recubrimiento con plasma.

Diferentes proporciones de los diversos tipos de colágeno, por ejemplo, depositados en el armazón pueden influir en el crecimiento de las células específicas de tejido u otras células que pueden inocularse más tarde sobre el armazón o que pueden crecer sobre la estructura *in vivo*. Como alternativa, el armazón puede inocularse con una mezcla de células que sinteticen los tipos de colágeno apropiados deseados. Dependiendo del tejido a cultivar, puede seleccionarse el tipo de colágeno apropiado a inocular en el armazón o que será producido por las células sembradas sobre el mismo. Por ejemplo, las cantidades relativas de las fibras colágenas y elásticas presentes en el armazón pueden modularse controlando la relación entre células productoras de colágeno y células productoras de elastina en el inóculo inicial. Por ejemplo, puesto que las paredes internas de las arterias son ricas en elastina, una matriz biodegradable arterial debería contener un cocultivo de células de músculo liso que secreten elastina.

El armazón tridimensional sembrado o inoculado de la invención puede ser para el trasplante o la implantación de las células cultivadas obtenidas a partir de la matriz o de la propia matriz cultivada *in vivo*. Las matrices biodegradables tridimensionales pueden utilizarse, según la invención, para reemplazar o aumentar el tejido existente, para introducir tejido nuevo o modificado, para modificar prótesis artificiales o para unir estructuras o tejidos biológicos. Por ejemplo y no a modo de limitación, el armazón tridimensional también puede utilizarse para construir tejidos tubulares de una o varias capas *in vitro* que puedan hacer de sustituto del tejido tubular dañado o enfermo *in vivo*.

Puede cortarse una matriz biodegradable en una tira (por ejemplo, de forma rectangular) cuya anchura sea aproximadamente igual a la circunferencia interior de un órgano tubular, por ejemplo, los cálculos o el uréter, en el que se insertará en última instancia. Las células pueden inocularse sobre la matriz biodegradable e incubarse por flotación o suspensión en medios líquidos. En la fase de confluencia apropiada, la matriz biodegradable puede enrollarse en forma de tubo juntando los bordes largos. La junta puede cerrarse suturando los dos bordes mediante fibras de un material adecuado de un diámetro apropiado.

Según la invención, una matriz biodegradable puede conformarse en forma de tubo, inocularse con células derivadas de tejido de cordón umbilical y suspenderse en medios en una cámara de incubación. A fin de evitar que las células ocluyan el diámetro interior, uno de los extremos abiertos del armazón tubular puede fijarse a una boquilla. Pueden hacerse pasar medios líquidos a través de esta boquilla desde una cámara fuente conectada a la cámara de incubación para crear una corriente a través del interior del armazón tubular. El otro extremo abierto puede fijarse a una abertura de salida que conduzca a una cámara de recogida desde la que puedan hacerse recircular los medios a través de la cámara fuente. El tubo puede separarse de la boquilla y de la abertura de salida cuando se dé por terminada la incubación. Este método se describe en Ballermann, B.J., *et al.*, solicitud internacional N° WO 94/25584 y en la solicitud de EE.UU. con N° de serie 08/430.768, que se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

En general, pueden combinarse dos armazones tridimensionales en un tubo según la invención utilizando cualquiera de los siguientes métodos. Pueden colocarse dos o más armazones planos uno encima de otro y suturarse. A continuación, puede enrollarse esta lámina de dos capas y, como se ha descrito anteriormente, juntarse y fijarse.

Puede inocularse una matriz biodegradable tubular, que hará de capa interna, con células derivadas de tejido de cordón umbilical e incubarse. Puede cultivarse una segunda matriz biodegradable en forma de tira plana con una anchura ligeramente mayor que la circunferencia exterior del armazón tubular. Después de lograr el crecimiento apropiado, puede envolverse el armazón plano alrededor del exterior de la matriz biodegradable tubular, seguido del cierre de la junta de los dos bordes del armazón plano y, preferentemente, fijando el armazón plano al tubo interior.

Pueden cultivarse por separado dos o más mallas tubulares de diámetros ligeramente diferentes. El armazón con el diámetro más pequeño puede insertarse dentro del más grande y fijarse.

Para cada uno de estos métodos, pueden añadirse más capas volviendo a aplicar el método al tubo de doble capa. Las matrices biodegradables pueden combinarse en cualquier etapa del crecimiento de las células derivadas de tejido de cordón umbilical, y puede continuarse la incubación de las matrices biodegradables combinadas cuando así convenga.

El aspecto diámetro interior del constructo tubular puede estar compuesto por o tratado con materiales que

hagan la superficie del diámetro interior de la matriz biodegradable tubular no trombogénica. Estos tratamientos y materiales también pueden promover y mantener el crecimiento endotelial, la migración y la deposición de matriz extracelular. Los ejemplos de estos materiales y tratamientos incluyen, pero no se limitan a, materiales naturales tales como proteínas de la membrana basal, tales como laminina y colágeno tipo IV, materiales sintéticos tal como ePTFE, y siliconas de poliuretano urea segmentadas, tal como PURSPAN® (The Polymer Technology Group, Inc., Berkeley, CA). Estos materiales pueden tratarse adicionalmente para hacer la superficie del diámetro interior de la matriz biodegradable tubular no trombogénica. Tales tratamientos incluyen antitrombóticos tales como la heparina, y tratamientos que modifican la carga superficial del material, tal como el recubrimiento con plasma.

En algunas formas de realización actualmente preferentes, los métodos comprenden inducir las células terapéuticas derivadas del posparto a diferenciarse en una vía celular renal, hacia fenotipos de células renales, o progenitoras o parientes más primitivos de las anteriores. Las composiciones de células terapéuticas pueden integrarse en el riñón del paciente, o como alternativa, pueden proporcionar apoyo para el crecimiento o estímulo para la diferenciación de las células madre renales presentes de forma natural. Las células terapéuticas pueden coadministrarse con lisados celulares, o con otras células alogénicas, singénicas o autólogas. La supervivencia de las células proporcionadas al administrar las composiciones de células terapéuticas no es determinante para el éxito o los resultados de su uso, más bien es la mejora de la salud renal, o la salud general del paciente lo que determina el resultado. Por lo tanto, no es necesario que las células se integren en el riñón del paciente, o incluso en los vasos sanguíneos, pero los indicios de mejoras en la salud renal en el paciente antes y después del tratamiento incluyen preferentemente al menos una de las mediciones objetivas de la salud renal tales como, pero no limitadas a, mejoras realizadas en el análisis de orina o suero para creatinina, urea, proteínas, nitrógeno ureico en sangre (BUN) y las pruebas de osmolaridad, y las evaluaciones subjetivas (incluida la autoevaluación) del estado del paciente.

Por lo tanto, un tratamiento eficaz podría comprender el tratamiento de un paciente que tiene una enfermedad, patología o un traumatismo en el riñón con una composición de células terapéuticas que comprenda las células derivadas de tejido de cordón umbilical, en presencia o ausencia de otro tipo de célula. Por ejemplo, y no a modo de limitación, las células preferentemente se integran, multiplican o sobreviven en el paciente, al menos parcialmente. En otras formas de realización preferentes, el paciente experimenta los beneficios del tratamiento, por ejemplo, de la capacidad de las células para apoyar el crecimiento de otras células, incluidas las células madre o células progenitoras presentes en el riñón, del crecimiento interno del tejido o de la vascularización del tejido y de la presencia de quimiocinas, citocinas, factores celulares beneficiosos, y similares, pero las células no se integran ni multiplican en el paciente. En algunos aspectos, el paciente se beneficia del tratamiento terapéutico con las células, pero las células no sobreviven durante un período prolongado en el paciente. Por ejemplo, en una forma de realización, las células disminuyen gradualmente en número, viabilidad o actividad bioquímica, en otras formas de realización, el deterioro de las células puede estar precedido por un período de actividad, por ejemplo de crecimiento, división o actividad bioquímica. En otras formas de realización, las células senescentes, no viables o incluso muertas son capaces de tener un efecto terapéutico beneficioso.

La administración es preferentemente *in vivo* mediante trasplante, implante, inyección, fusión, administración a través de catéter o proporcionando un complejo de matriz-célula, o cualquier otro medio conocido en la técnica para proporcionar la terapia celular.

En algunos aspectos, los métodos de la invención pueden comprender adicionalmente evaluar al paciente para las mejoras en la estructura y/o función renal, o las mejoras en la salud global. Tales evaluaciones pueden desarrollarse según cualquier medio adecuado en la técnica, incluidos los descritos y ejemplificados en el presente documento.

También se presentan según la presente invención kits para poner en práctica los métodos de la invención. En un aspecto, se proporcionan kits para el tratamiento de un paciente con lesión o insuficiencia renal aguda o enfermedad renal crónica. Los kits comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable, células obtenidas de tejido de cordón umbilical humano en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad o lesión, que son las células que se describen y ejemplifican en el presente documento, e instrucciones para utilizar el kit en un método para tratar a un paciente con lesión o insuficiencia renal aguda o enfermedad renal crónica. Los kits pueden comprender adicionalmente al menos un reactivo e instrucciones para cultivar las células. Los kits pueden comprender adicionalmente una población de al menos otro tipo de célula y/o al menos un agente.

En algunos aspectos, los kits comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable, un lisado, matriz extracelular o medio acondicionado preparado a partir de células obtenidas de tejido de cordón umbilical humano, células que tienen las características que se describen y ejemplifican en el presente documento. Los kits tienen utilidad para facilitar la reparación y/o regeneración de un riñón que está dañado o enfermo.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir la invención con mayor detalle. Pretenden ilustrar, no limitar, la invención.

EJEMPLO 1

Aislamiento de células derivadas de tejido de cordón umbilical

Los cordones umbilicales se obtuvieron del National Disease Research Interchange (NDRI, Filadelfia, PA). Los tejidos se obtuvieron tras partos normales. El protocolo de aislamiento de las células se realizó asépticamente en una campana de flujo laminar. Para eliminar la sangre y los residuos, se lavó el cordón en solución salina tamponada con fosfato (PBS; Invitrogen, Carlsbad, CA) en presencia de antimicótico y antibiótico (100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomina, 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina B). A continuación, se disociaron mecánicamente los tejidos en placas de cultivo de tejidos de 150 cm² en presencia de 50 mililitros de medio (DMEM-con bajo contenido en glucosa o DMEM-con alto contenido en glucosa; Invitrogen), hasta que el tejido se picó finamente hasta una pulpa fina. Los tejidos picados se transfirieron a tubos cónicos de 50 ml (aproximadamente 5 gramos de tejido por tubo). A continuación, se digirió el tejido en medio DMEM-con bajo contenido en glucosa o medio DMEM-con alto contenido en glucosa, conteniendo cada uno antimicótico y antibiótico como se ha descrito anteriormente. En algunos experimentos, se utilizó una mezcla enzimática de colagenasa y dispasa ("C:D;" colagenasa (Sigma, St Louis, MO), 500 unidades/mililitro, y dispasa (Invitrogen), 50 unidades/mililitro en medio DMEM:-con bajo contenido en glucosa). En otros experimentos se utilizó una mezcla de colagenasa, dispasa e hialuronidasa ("C:D:H") (colagenasa, 500 unidades/mililitro; dispasa, 50 unidades/mililitro y hialuronidasa (Sigma), 5 unidades/mililitro, en DMEM:-con bajo contenido en glucosa). Los tubos cónicos que contenían el tejido, el medio y las enzimas de digestión se incubaron a 37°C en un agitador orbital (Environ, Brooklyn, NY) a 225 rpm durante 2 horas.

Después de la digestión, los tejidos se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos y se aspiró el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 20 mililitros de medio de crecimiento (DMEM:con bajo contenido en glucosa (Invitrogen), suero bovino fetal al 15 por ciento (v/v) (FBS; suero bovino definido; Lote#AND18475; Hyclone, Logan, UT), 2-mercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma), 1 mililitro por 100 mililitros de antibiótico/antimicótico como se ha descrito anteriormente. La suspensión celular se filtró a través de un filtro celular de nailon de 70 micrómetros (BD Biosciences). Se hizo pasar a través del filtro un aclarado adicional de 5 mililitros que comprendía medio de crecimiento. A continuación, se hizo pasar la suspensión celular a través de un filtro celular de nailon de 40 micrómetros (BD Biosciences) y seguido de un aclarado con 5 mililitros más de medio de crecimiento.

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

Tras la centrifugación final, se aspiró el sobrenadante y se resuspendió el sedimento celular en 5 mililitros de medio de crecimiento de nueva aportación. El número de células viables se determinó mediante tinción azul de tripano. A continuación se cultivaron las células en condiciones convencionales.

Las células aisladas a partir de cordones umbilicales se sembraron a 5.000 células/cm² en matraces T de 75 cm² recubiertos con gelatina (Corning Inc., Corning, NY) en medio de crecimiento con antibióticos/antimicóticos como se ha descrito anteriormente. Al cabo de 2 días (en diversos experimentos, las células se incubaron de 2-4 días), se aspiró de los matraces el medio gastado. Las células se lavaron con PBS tres veces para eliminar los residuos y las células derivadas de la sangre. A continuación se reabasteció a las células con medio de crecimiento y se dejaron crecer hasta la confluencia (aproximadamente 10 días del pase 0 al pase 1). En los pases posteriores (del pase 1 al 2 y así sucesivamente), las células alcanzaron la subconfluencia (confluencia del 75-85 por ciento) en 4-5 días. Para estos pases posteriores, las células se sembraron a 5.000 células/cm². Las células se cultivaron en un incubador humidificado con oxígeno atmosférico y dióxido de carbono al 5 por ciento, a 37°C.

EJEMPLO 2**Evaluación de marcadores de superficie de células derivadas de posparto humanas mediante citometría de flujo**

El tejido de cordón umbilical se caracterizó mediante citometría de flujo para proporcionar un perfil para la identificación de las células obtenidas del mismo.

Las células se cultivaron en medio de crecimiento (Gibco Carlsbad, CA) con penicilina/estreptomina. Las células se cultivaron en matraces de cultivo de tejidos T75, T225 y T150 tratados con plasma (Corning, Corning, NY) hasta la confluencia. Las superficies de crecimiento de los matraces se recubrieron con gelatina, incubando gelatina al 2% (p/v) (Sigma, St. Louis, MO) durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Las células adherentes en los matraces se lavaron en PBS y se desprendieron con tripsina/EDTA. Las células se recolectaron, se centrifugaron y se resuspendieron en FBS al 3% (v/v) en PBS a una concentración celular de 1×10^7 por mililitro. Según las especificaciones del fabricante, se añadió el anticuerpo contra el marcador de superficie celular de interés (véase más adelante) a cien microlitros de suspensión celular y se incubó la mezcla 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. Se resuspendieron las células en 500 microlitros de PBS y se

analizaron mediante citometría de flujo. El análisis de citometría de flujo se realizó con un instrumento FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Se utilizaron los siguientes anticuerpos contra marcadores de superficie celular.

5

	Anticuerpo	Fabricante	Número de catálogo
	CD10	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555375
	CD13	BD Pharmingen	555394
10	CD31	BD Pharmingen	555446
	CD34	BD Pharmingen	555821
	CD44	BD Pharmingen	555478
	CD45RA	BD Pharmingen	555489
	CD73	BD Pharmingen	550257
15	CD90	BD Pharmingen	555596
	CD117	BD Pharmingen	340529
	CD141	BD Pharmingen	559781
	PDGFr-alfa	BD Pharmingen	556002
	HLA-A, B, C	BD Pharmingen	555553
20	HLA-DR,DP,DQ	BD Pharmingen	555558
	IgG-FITC	Sigma (St. Louis, MO)	F-6522
	IgG-PE	Sigma	P-4685

25 Se analizaron las células en los pases 8, 15 y 20, y se compararon entre sí las células derivadas de tejido de cordón umbilical de diferentes donantes. Además, las células cultivadas en matraces recubiertos con gelatina se compararon con las células cultivadas en matraces no recubiertos.

30 Las células derivadas de tejido de cordón umbilical mostraron expresión positiva de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, indicado por el aumento de los valores de fluorescencia con respecto al control IgG. Estas células fueron negativas para la expresión detectable de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ, indicado por los valores de fluorescencia comparables al control IgG. Se explicaron las variaciones en los valores de fluorescencia de las curvas positivas. La media (es decir, CD13) y el rango (es decir, CD90) de las curvas positivas mostraron cierta variación, pero las curvas parecían normales, lo que confirma una población homogénea. Ambas curvas presentaron individualmente valores superiores al control IgG.

35 Todas las células en el pase 8, 15 y 20 expresaron CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, indicado por el aumento de fluorescencia con respecto al control IgG. Estas células fueron negativas para CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ, indicado por los valores de fluorescencia coherentes con el control IgG.

40 Cada uno de los aislados de distintos donantes mostró expresión positiva de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, que se refleja en el aumento de los valores de fluorescencia con respecto al control IgG. Estas células fueron negativas para la expresión de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ con valores de fluorescencia coherentes con el control IgG.

45 Todas las células multiplicadas en gelatina y en matraces no recubiertos fueron positivas para la expresión de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, con mayores valores de fluorescencia con respecto al control IgG. Estas células fueron negativas para la expresión de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ, con valores de fluorescencia coherentes con el control IgG.

50 Por lo tanto, las células derivadas de tejido de cordón umbilical son positivas para CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, HLA-A,B,C y negativas para CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ. Esta identidad fue coherente entre las variaciones en las variables, incluido el donante, el pase y el recubrimiento de la superficie del recipiente de cultivo. Se observó cierta variación en las medias y rangos de la curva del histograma del valor de fluorescencia individual, pero todas las curvas positivas en todas las condiciones ensayadas fueron normales y expresaron valores de fluorescencia superiores al control IgG, lo que confirma que las células comprenden una población homogénea que tiene expresión positiva de los marcadores.

60 EJEMPLO 3

Caracterización inmunohistoquímica de fenotipos celulares

65 Se recolectó tejido de cordón umbilical humano y se fijó por inmersión en paraformaldehído al 4% (p/v) durante la noche a 4°C. La inmunohistoquímica se realizó utilizando anticuerpos dirigidos contra los siguientes epítomos: vimentina (1:500; Sigma, St. Louis, MO), desmina (1:150, generado contra conejo; Sigma; o 1:300, generado 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 de Clase III humano; 1:100; DAKOCytomation, Carpinteria, CA). Además, se ensayaron los siguientes marcadores: anti-GRO-alfa humana - PE (1:100; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), anti-GCP-2 humana (1:100; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), anti-receptor 1 de LDL oxidada humano (ox-LDL R1; 1:100; Santa Cruz Biotech) y anti-NOGO-A humana (1:100; Santa Cruz Biotech). Las muestras fijadas se recortaron con un bisturí y se colocaron dentro de compuesto de inclusión OCT (Tissue-Tek OCT; Sakura, Torrance, CA) en un baño de hielo seco que contenía etanol. A continuación se seccionaron los bloques congelados (10 µm de espesor) utilizando un criostato convencional (Leica Microsystems) y se montaron en portaobjetos de vidrio para la tinción.

La inmunohistoquímica se realizó de forma similar a los estudios anteriores (Messina *et al.* (2003) *Exper. Neurol.* 184:816-29). En resumen, las secciones de tejido se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una solución de bloqueo de proteínas que contenía PBS, suero de cabra al 4% (v/v) (Chemicon, Temecula, CA) y Triton al 0,3% (v/v) (Triton X-100; Sigma) durante 1 hora para acceder a los antígenos intracelulares. En los casos en que el epítipo de interés estaba situado en la superficie celular (CD34, ox-LDL R1), se omitió el Triton en todas las etapas del procedimiento a fin de evitar la pérdida del epítipo. Además, en los casos en que el anticuerpo primario se generó contra cabra (GCP-2, ox-LDL R1, NOGO-A), se utilizó durante todo el procedimiento suero de burro al 3% (v/v) en lugar de suero de cabra. A continuación, se aplicaron a las secciones los anticuerpos primarios, diluidos en solución de bloqueo, durante un período de 4 horas a temperatura ambiente. Se eliminaron las soluciones de anticuerpo primario y se lavaron los cultivos con PBS antes de aplicar las soluciones de anticuerpo secundario (1 hora a temperatura ambiente) que contenían el bloque junto con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón - Texas Red (1:250; Molecular Probes, Eugene, OR) y/o de cabra anti-IgG de conejo - Alexa 488 (1:250; Molecular Probes) o de burro anti-IgG de cabra - FITC (1:150; Santa Cruz Biotech). Se lavaron los cultivos y se aplicó DAPI 10 micromolar (Molecular Probes) durante 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.

La fluorescencia se visualizó utilizando el filtro de fluorescencia apropiado en un microscopio de epifluorescencia invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). La tinción positiva se representó mediante una señal de fluorescencia por encima de la tinción de control. Se capturaron imágenes representativas utilizando una cámara de vídeo digital en color y el software ImagePro (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para las muestras con triple tinción, cada imagen se obtuvo utilizando sólo un filtro de emisión a la vez.

Los marcadores vimentina, desmina, SMA, CK18, vWF y CD34 se expresaron en un subconjunto de las células que se encontraban dentro del cordón umbilical. En concreto, la expresión de vWF y CD34 se restringió a los vasos sanguíneos contenidos en el cordón. Las células CD34+ estaban en la capa más interna (lado del diámetro interior). Se encontró expresión de vimentina en toda la matriz y los vasos sanguíneos del cordón. La SMA se limitó a la matriz y a las paredes exteriores de la arteria y la vena, pero no estaba contenida en los vasos mismos. Se observaron CK18 y desmina dentro de los vasos solamente, limitándose la desmina a las capas intermedia y exterior. No se observó expresión de GRO-alfa, GCP-2, ox-LDL R1 y NOGO-A en el tejido de cordón umbilical.

EJEMPLO 4

Análisis de matriz de oligonucleótidos

Se utilizaron matrices GeneChip® de Affymetrix para comparar los perfiles de expresión génica de células derivadas de tejido de cordón umbilical con fibroblastos, células madre mesenquimales humanas, y otra línea celular derivada de médula ósea humana. Este análisis proporcionó una caracterización de las células derivadas del posparto e identificó marcadores moleculares únicos para estas células.

Se obtuvieron cordones umbilicales humanos del National Disease Research Interchange (NDRI, Filadelfia, PA) de partos normales a término con el consentimiento del paciente. Se recibieron los tejidos y se aislaron las células como se ha descrito anteriormente. Las células se cultivaron en medio de crecimiento (utilizando DMEM-LG) en matraces de plástico de cultivo de tejido recubiertos con gelatina. Los cultivos se incubaron a 37°C con CO₂ al 5%.

Se adquirieron fibroblastos dérmicos humanos de Cambrex Incorporated (Walkersville, MD; número de lote 9F0844) y ATCC CRL-1501 (CCD39SK). Se cultivaron ambas líneas en medio DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA) con suero bovino fetal al 10% (v/v) (Hyclone) y penicilina/estreptomycin (Invitrogen). Las células se cultivaron en plástico tratado para tejidos convencional.

Se adquirieron células madre mesenquimales humanas (hMSC) de Cambrex Incorporated (Walkersville, MD; números de lote 2F1655, 2F1656 y 2F1657) y se cultivaron según las especificaciones del fabricante en medio MSCGM (Cambrex). Se cultivaron las células en plástico para cultivo de tejidos convencional a 37°C con CO₂ al 5%.

Se recibió médula ósea de cresta ilíaca del NDRI con el consentimiento del paciente. La médula ósea se procesó según el método descrito por Ho, *et al.* (WO03/0251149). La médula se mezcló con tampón de lisis (NH₄Cl 155 mM, KHCO₃ 10 mM y EDTA 0,1 mM, pH 7,2) en una relación de 1 parte de médula ósea y 20 partes tampón de lisis. La suspensión de células se agitó en vórtex, se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente y se

centrifugó durante 10 minutos a 500 x g. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento celular en medio esencial mínimo alfa (Invitrogen) complementado con suero bovino fetal al 10% (v/v) y glutamina 4 mM. Se centrifugaron de nuevo las células y se resuspendió el sedimento celular en medio de nueva aportación. Las células mononucleares viables se contaron mediante exclusión con azul de tripano (Sigma, St. Louis, MO). Las células mononucleares se sembraron en matraces de plástico para cultivo de tejidos a 5×10^4 células/cm². Las células se incubaron a 37°C con CO₂ al 5% en O₂ atmosférico estándar u O₂ al 5%. Las células se cultivaron durante 5 días sin cambio de medio. Los medios y las células no adherentes se eliminaron al cabo de 5 días de cultivo. Las células adherentes se mantuvieron en cultivo.

Los cultivos de células en crecimiento activo se extrajeron de los matraces con un raspador de células en PBS frío. Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 300 x g. Se aspiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en PBS de nueva aportación y se centrifugaron de nuevo. Se aspiró el sobrenadante y el sedimento celular se congeló inmediatamente y se almacenó a -80°C. Se extrajo el ARNm celular y se transcribió a ADNc, que a continuación se transcribió a ARNc y se marcó con biotina. El ARNc marcado con biotina se hibridó con la matriz de oligonucleótidos HG-U133A GeneChip (Affymetrix, Santa Clara CA). La hibridación y la recogida de datos se realizaron según las especificaciones del fabricante. Los análisis se realizaron mediante el software informático "Significance Analysis of Microarrays" (SAM) versión 1.21 (Universidad de Stanford; Tusher *et al.* (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 98:5116-21.).

Se analizaron catorce poblaciones diferentes de células. Las células junto con la información del pase, el sustrato de cultivo y los medios de cultivo se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1

Células analizadas mediante el estudio de micromatrices. Las líneas celulares se enumeran por código de identificación junto con el pase en el momento del análisis, el sustrato de crecimiento celular y el medio de crecimiento			
Población de células	Pase	Sustrato	Medio
Cordón umbilical (022803)	2	Gelatina	DMEM, FBS al 15%, 2-ME
Cordón umbilical (042103)	3	Gelatina	DMEM, FBS al 15%, 2-ME
Cordón umbilical (071003)	4	Gelatina	DMEM, FBS al 15%, 2-ME
ICBM (070203) (O ₂ al 5%)	3	Plástico	MEM, FBS al 10%
ICBM (062703) (O ₂ est.)	5	Plástico	MEM, FBS al 10%
ICBM (062703) (O ₂ al 5%)	5	Plástico	MEM, FBS al 10%
hMSC (Lote 2F1655)	3	Plástico	MSCGM
hMSC (Lote 2F1656)	3	Plástico	MSCGM
hMSC (Lote 2F 1657)	3	Plástico	MSCGM
hFibroblasto (9F0844)	9	Plástico	DMEM-F12, FBS al 10%
hFibroblasto (CCD39SK)	4	Plástico	DMEM-F12, FBS al 10%

Los datos se evaluaron mediante un análisis de componentes principales, analizando los 290 genes que se expresaban diferencialmente en las células. Este análisis permite una comparación relativa de las similitudes entre las poblaciones. La Tabla 2 muestra las distancias euclidianas que se calcularon para la comparación de los pares de células. Las distancias euclidianas se basaron en la comparación de las células en base a los 290 genes que se expresaban diferencialmente entre los tipos de células. La distancia euclidiana es inversamente proporcional a la similitud entre la expresión de los 290 genes (es decir, a mayor distancia, menor similitud existe).

Tabla 2

Distancias euclidianas para los pares de células	
Par de células	Distancia euclidiana
ICBM-hMSC	24,71
Placenta-umbilical	25,52
ICBM-Fibroblasto	36,44
ICBM-placenta	37,09
Fibroblasto-MS	39,63
ICBM-Umbilical	40,15
Fibroblasto-Umbilical	41,59
MSC-Placenta	42,84
MSC-Umbilical	46,86
ICBM-placenta	48,41

Las Tablas 3 y 4 que se presentan a continuación muestran la expresión de genes aumentada en las células derivadas de tejido de cordón umbilical (Tabla 3), y reducida en las células derivadas de tejido de cordón umbilical (Tabla 4). La columna titulada "ID del conjunto de sondas" se refiere al código de identificación del

fabricante para los conjuntos de varias sondas de oligonucleótidos situadas en un sitio concreto en la matriz, que hibridan con el gen nombrado (columna "Nombre del gen"), que comprende una secuencia que puede encontrarse dentro de la base de datos del NCBI (GenBank) en el número de registro especificado (columna "número de registro del NCBI").

5

Tabla 3

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Los genes demostraron tener una expresión específicamente aumentado en las células derivadas de tejido de cordón umbilical, en comparación con otras líneas celulares ensayadas		
Genes aumentados en las células de derivadas de tejido de cordón umbilical		
ID del conjunto de sondas	Nombre del gen	Número del registro del NCBI
202859_x_at	interleucina 8	NM_000584
211506_s_at	interleucina 8	AF043337
210222_s_at	reticulón 1	BC000314
204470_at	ligando 1 de quimiocina (motivo C-X-C) (actividad estimuladora del crecimiento de melanomas)	NM_001511
206336_at	ligando 6 de quimiocina (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica para granulocitos)	NM_002993
207850_at	ligando 3 de quimiocina (motivo C-X-C)	NM_002090
203485_at	reticulón 1	NM_021136
202644_s_at	factor de necrosis tumoral, proteína 3 inducida por alfa	NM_006290

Tabla 4

Los genes demostraron tener una expresión disminuida en las células derivadas de tejido de cordón umbilical en comparación con otras líneas celulares ensayadas

Genes disminuidos en las células derivadas de placenta y derivadas de tejido de cordón umbilical		
ID del conjunto de sondas	Nombre el gen	Número de registro del NCBI
210135_s_at	caja homeótica de la baja estatura 2	AF022654.1
205824_at	proteína 2 de choque térmico de 27 kDa	NM_001541.1
209687_at	ligando 12 de quimiocina (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células del estroma)	U19495.1
203666_at	ligando 12 de quimiocina (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células del estroma)	NM_000609.1
212670_at	elastina (estenosis aórtica supraavalvular, síndrome de Williams-Beuren)	AA479278
213381_at	ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022)	N91149
206201_s_at	caja homeótica de mesénquima 2 (caja homeótica específica de la detención del crecimiento)	NM_005924.1
205817_at	homólogo 1 de caja homeótica de "sine oculis" (<i>Drosophila</i>)	NM_005982.1
209283_at	cristalino, alfa B	AF007162.1
212793_at	activador 2 de la morfogénesis asociado a "disheveled"	BF513244
213488_at	proteína DKFZP586B2420	AL050143.1
209763_at	similar a neuralina 1	AL049176
205200_at	tetranectina (proteína de unión a plasminógeno)	NM_003278.1
205743_at	de homología con src tres (SH3) y dominio rico en cisteína	NM_003149.1
200921_s_at	gen 1 de translocación de linfocitos B, anti-proliferativa	NM_001731.1
206932_at	colesterol 25-hidroxilasa	NM_003956.1
204198_s_at	factor de transcripción 3 relacionado con enanismo	AA541630
219747_at	proteína hipotética FLJ23191	NM_024574.1
204773_at	receptor de interleucina 11, alfa	NM_004512.1
202465_at	potenciador de procolágeno C-endopeptidasa	NM_002593.2
203706_s_at	homólogo 7 de "frizzled" (<i>Drosophila</i>)	NM_003507.1
212736_at	gen hipotético BC008967	BE299456
214587_at	colágeno, tipo VIII, alfa 1	BE877796
201645_at	tenascina C (hexabraquion)	NM_002160.1
210239_at	proteína 5 de la caja homeótica de "iroquois"	U90304.1
203903_s_at	hepaestina	NM_014799.1
205816_at	integrina, beta 8	NM_002214.1
203069_at	glicoproteína 2 de las vesículas sinápticas	NM_014849.1
213909_at	ADNc FLJ12280 fis de <i>Homo sapiens</i> , clon MAMMA1001744	AU147799
206315_at	factor 1 similar a receptor de citocinas	NM_004750.1
204401_at	canal de potasio activado por calcio de conductancia intermedia/baja, subfamilia N, miembro 4	NM_002250.1
216331_at	integrina, alfa 7	AK022548.1
209663_s_at	integrina, alfa 7	AF072132.1
213125_at	proteína DKFZP586L151	AW007573
202133_at	coactivador de la transcripción con motivo de unión a PDZ (TAZ)	AA081084
206511_s_at	homólogo 2 de la caja homeótica de "sine oculis" (<i>Drosophila</i>)	NM_016932.1
213435_at	proteína KIAA1034	AB028957.1
206115_at	de respuesta de crecimiento precoz 3	NM_004430.1
213707_s_at	caja homeótica 5 de "distal-less"	NM_005221.3

5	218181_s_at	proteína hipotética FLJ20373	NM_017792.1
	209160_at	familia 1 de aldo-ceto reductasa, miembro C3 (3-alfa hidroxisteroide deshidrogenasa, tipo II)	AB018580.1
	213905_x_at	biglicano	AA845258
	201261_x_at	biglicano	BC002416.1
	202132_at	coactivador de la transcripción con motivo de unión a PDZ (TAZ)	AA081084
10	214701_s_at	fibronectina 1	AJ276395.1
	213791_at	proencefalina	NM_006211.1
	205422_s_at	integrina, similar a beta 1 (con dominios de repetición de tipo EGF)	NM_004791.1
15	214927_at	clon EUROIMAGE 1968422 de ADNc de inserto de longitud completa de ARNm de <i>Homo sapiens</i>	AL359052.1
	206070_s_at	EphA3	AF213459.1
	212805_at	proteína KIAA0367	AB002365.1
	219789_at	receptor C del péptido natriurético/guanilato ciclasa C (receptor C del péptido atrial natriurético)	AI628360
20	219054_at	proteína hipotética FLJ14054	NM_024563.1
	213429_at	ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222)	AW025579
	204929_s_at	proteína 5 de membrana asociada a vesículas (miobrevina)	NM_006634.1
25	201843_s_at	proteína 1 de la matriz extracelular de tipo fibulina que contienen EGF	NM_004105.2
	221478_at	similar a proteína 3 de interacción con BCL2/adenovirus E1B 19kDa	AL132665.1
	201792_at	proteína 1 de unión a AE	NM_001129.2
30	204570_at	polipéptido 1 de la subunidad VIIa de la citocromo c oxidasa (músculo)	NM_001864.1
	201621_at	neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1	NM_005380.1
	202718_at	proteína 2 de unión al factor de crecimiento insulinoide, de 36kDa	NM_000597.1

35 Las tablas 5, 6 y 7 muestran la expresión de genes aumentada en fibroblastos humanos (Tabla 5), células ICBM (Tabla 6) y MSC (Tabla 7).

40 **Tabla 5**

45	Genes que demostraron tener una expresión aumentada en los fibroblastos en comparación con las demás líneas celulares ensayadas
	Genes aumentados en fibroblastos
	fosfatasa de doble especificidad 2
	proteína KIAA0527
	ADNc de <i>Homo sapiens</i> : FLJ23224 fis, clon ADSU02206
	dineína, citoplasmática, polipéptido intermedio 1
	anquirina 3, nódulo de Ranvier (anquirina G)
50	inhibina, beta A (activina A, activina AB, polipéptido alfa)
	ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 4 (función supuesta)
	proteína KIAA1053
	proteína asociada a microtúbulos 1A
	proteína con dedos de zinc 41
55	proteína HSPC019
	ADNc de <i>Homo sapiens</i> : FLJ23564 fis, clon LNG10773
	ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp564A072 (del clon DKFZp564A072)
	Proteína LIM (similar a enigma de unión a proteína quinasa C de rata)
60	inhibidor del potenciador del gen del polipéptido de cadena ligera kappa en los linfocitos B, proteína asociada a complejo quinasa
	proteína hipotética FLJ22004
	Secuencia de ARNm humano (clon CTG-A4)
65	EST, Moderadamente similares al factor 2 de tipo receptor de citocinas; precursor del receptor de citocinas CRL2 [<i>Homo sapiens</i>]

factor de crecimiento transformante, beta 2
proteína hipotética MGC29643
antígeno identificado por el anticuerpo monoclonal MRC OX-2
supuesta proteína de la retinopatía ligada a X

Tabla 6

Genes que demostraron una expresión aumentada en células derivadas de ICBM en comparación con las demás líneas celulares ensayadas.
Genes aumentados en células ICBM
• proteína con repeticiones de anquirina cardiaca
• MHC clase I, región ORF
• integrina, alfa 10
• proteína hipotética FLJ22362
• UDP-N-acetil-alfa-D-galactosamina:polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 3 (GalNAc-T3)
• proteína inducida por interferón 44
• caja SRY (región Y determinante del sexo)-9 (displasia campomélica, inversión sexual autosómica)
• proteína-1 asociada a queratina 1
• tipo hipocalcina 1
• jagged 1 (síndrome de Alagille)
• proteoglicano 1, gránulo secretor

Tabla 7

Genes que demostraron tener una expresión aumentada en las células MSC en comparación con las demás líneas celulares ensayadas
Genes aumentados en células MSC
• interleucina 26
• maltasa-glucoamilasa (alfa-glucosidasa)
• subfamilia de receptores nucleares 4, grupo A, miembro 2
• homólogo del oncogén viral de osteosarcoma murino v-fos FBJ
• proteína hipotética DC42
• subfamilia de receptores nucleares 4, grupo A, miembro 2
• homólogo B del oncogén viral de osteosarcoma murino FBJ
• proteína 1 de la vía de señalización inducible por WNT1
• secuencia transformante derivada de línea celular MCF.2
• canal de potasio, subfamilia K, miembro 15
• homeoproteína clase paired de cartilago 1
• ADNc de <i>Homo sapiens</i> FLJ12232 fis, clon MAMMA1001206
• ADNc de <i>Homo sapiens</i> FLJ34668 fis, clon LIVER2000775
• protooncogén jun B
• LLC de linfocitos B/linfoma 6 (proteína con dedos de zinc 51)
• proteína con dedos de zinc 36, tipo C3H, homólogo (ratón)

El análisis anterior incluía células derivadas de tres cordones umbilicales diferentes y dos líneas diferentes de fibroblastos dérmicos, tres líneas de células madre mesenquimales y tres líneas de células de médula ósea de cresta ilíaca. El ARNm que fue expresado por estas células se analizó utilizando una matriz de oligonucleótidos que contenía sondas para 22.000 genes. Los resultados mostraron que 290 genes se expresan diferencialmente en estos cinco tipos de células diferentes. Estos genes incluyen siete genes aumentados específicamente en las células derivadas de tejido de cordón umbilical. Se ha descubierto que cincuenta y cuatro genes tienen niveles de expresión específicamente inferiores en las células derivadas de tejido de cordón umbilical, en comparación con los demás tipos de células. La expresión de los genes seleccionados se ha confirmado mediante PCR. Estos resultados demuestran que las células derivadas de tejido de cordón umbilical tienen un perfil de expresión génica distinto, por ejemplo, en comparación con los fibroblastos y las células derivadas de médula ósea.

EJEMPLO 5

Marcadores celulares en células derivadas de tejido de cordón umbilical

Como se ha demostrado anteriormente, se identificaron seis genes "firma" para las células derivadas de tejido de cordón umbilical: receptor 1 de LDL oxidada, interleucina-8, renina, reticulón, ligando 3 del receptor de quimiocinas (ligando 3 de CXC) y proteína 2 quimiotáctica para granulocitos (GCP-2). Estos genes "firma" se expresaron a niveles relativamente altos en las células derivadas de posparto.

Se llevaron a cabo los procedimientos descritos en este ejemplo para verificar los datos de micromatrices y encontrar concordancia/discordancia entre el gen y la expresión de proteínas, así como para establecer una serie de ensayos fiables para la detección de identificadores únicos para las células derivadas de tejido de cordón umbilical.

5 Se cultivaron células derivadas de tejido de cordón umbilical (cuatro aislados) y fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF; neonatales y adultos) en medio de crecimiento con penicilina/estreptomicina en un matraz T75 recubierto con gelatina. Se cultivaron células madre mesenquimales (MSC) en el kit Bullet de medio de crecimiento para células madre mesenquimales (MSCGM; Cambrex, Walkerville, MD).

10 Para el protocolo 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 a continuación se cultivaron durante otras 8 horas en 10 mililitros de medio de privación de suero [DMEM-bajo contenido en glucosa (Gibco, Carlsbad, CA), penicilina/estreptomicina (Gibco, Carlsbad, CA) y albúmina de suero bovino al 0,1% (p/v) (BSA; Sigma, St. Louis, MO)]. Después de este tratamiento, se extrajo el ARN y se centrifugaron los sobrenadantes a 150 x g durante 5 minutos para eliminar los desechos celulares. A continuación se congelaron los sobrenadantes a -80°C para el análisis ELISA.

20 Las células posparto derivadas del cordón umbilical, así como 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 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, se desechó el sobrenadante. Se resuspendieron las células en 4 mililitros de medio de cultivo y se contaron. Se cultivaron las células en un matraz de 75 cm² que contenía 15 mililitros de medio de crecimiento a 375.000 células/matraz durante 24 horas. El medio se cambió a un medio de privación de suero durante 8 horas. Al final de la incubación se recogió medio de privación de suero, se centrifugó a 14.000 x g durante 5 minutos (y se almacenó a -20°C).

25 Para hacer una estimación del número de células en cada matraz, se añadieron a cada matraz 2 mililitros de tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, CA). Una vez desprendidas las células del matraz, se neutralizó la actividad de la tripsina con 8 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. Se aspiró el sobrenadante y se añadió a cada tubo 1 mililitro medio de crecimiento para resuspender las células. Se hizo una estimación del número de células mediante un hemocitómetro.

30 La cantidad de IL-8 secretada por las células en el medio de privación de suero se analizó mediante ensayos ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN). Todos los ensayos se probaron según las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

35 Se extrajo el ARN de los fibroblastos y las células derivadas de tejido de cordón umbilical confluentes o para la expresión de IL-8 a partir 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 (RNeasy Mini Kit; Qiagen, Valencia, CA). El ARN se extrajo según las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit; Qiagen, Valencia, CA) y se sometió a tratamiento con ADNasa (2,7 U/muestra) (Sigma St. Louis, MO). Se eluyó el ARN con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se almacenó a -80°C.

40 El ARN se extrajo también de tejido de cordón umbilical humano. El tejido (30 miligramos) se suspendió en 700 microlitros de tampón RLT que contenía 2-mercaptoetanol. Las muestras se homogeneizaron mecánicamente y la extracción de ARN continuó según las especificaciones del fabricante. Se extrajo el ARN con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se almacenó a -80°C. El ARN se sometió a transcripción inversa utilizando 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.

45 Los genes identificados mediante micromatriz de ADNc como regulados únicamente en las células de posparto (genes firma – incluidos el receptor de LDL oxidada, interleucina-8, renina y reticulón) se investigaron adicionalmente utilizando PCR convencional y en tiempo real.

50 La PCR se realizó en muestras de ADNc utilizando los productos de expresión génica Assays-on-Demand™: se mezclaron receptor de LDL oxidada (Hs00234028); renina (Hs00166915); reticulón (Hs00382515); ligando 3 de CXC (Hs00171061); GCP-2 (Hs00605742); IL-8 (Hs00174103); y GAPDH (Applied Biosystems, Foster City, CA) con ADNc y mezcla maestra de PCR universal TaqMan según las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando un sistema de detección de secuencia 7000 con el software ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las condiciones de 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 de usuario N° 2 de Applied Biosystems para el sistema de detección de secuencia ABI Prism 7700).

55 Se realizó una PCR convencional utilizando un ABI PRISM 7700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Boston,

Massachusetts, EE.UU.) para confirmar los resultados de la PCR en tiempo real. La PCR se realizó utilizando 2 microlitros de solución de ADNc, 1 X tampón de reacción de PCR mezcla universal AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA) y desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos. La amplificación se optimizó para cada conjunto de cebadores. Para la IL-8, ligando 3 de CXC y reticulón (94°C durante 15 segundos, 55°C durante 15 segundos y 72°C durante 30 segundos durante 30 ciclos); para la renina (94°C durante 15 segundos, 53°C durante 15 segundos y 72°C durante 30 segundos durante 38 ciclos); para el receptor de LDL oxidada y GAPDH (94°C durante 15 segundos, 55°C durante 15 segundos y 72°C durante 30 segundos durante 33 ciclos). Los cebadores utilizados para la amplificación se enumeran en la Tabla 8. La concentración de cebador en la reacción de PCR final fue de 1 micromolar a excepción de la GAPDH, que fue de 0,5 micromolar. Los cebadores GAPDH fueron los mismos que la PCR en tiempo real, salvo que no se añadió a la reacción de PCR final la sonda TaqMan del fabricante. Las muestras se corrieron en gel de agarosa al 2% (p/v) y se tiñeron con bromuro de etidio (Sigma, St. Louis, MO). Las imágenes se capturaron utilizando una película 667 universal Twinpack (VWR International, South Plainfield, NJ) mediante una cámara Polaroid con distancia focal (VWR International, South Plainfield, NJ).

Tabla 8

Cebadores utilizados		
Nombre del cebador	Cebadores	
Receptor de LDL oxidada	S: 5'-GAGAAATCCAAAGAGCAAATGG-3'	(SEQ ID NO:1)
Renina	A: 5'-AGAATGGAAAAGTGAATAGG-3'	(SEQ ID NO:2)
	S: 5'-TCTTCGATGCTTCGGATTCC-3'	(SEQ ID NO:3)
	A: 5'-GAATCTCGGAATCTGTGTTG-3'	(SEQ ID NO:4)
Reticulón	S: 5'-TTACAAGCAGTGCAGAAAACC-3'	(SEQ ID NO:5)
	A: 5'-AGTAAACATTGAAACCACAGCC-3'	(SEQ ID NO:6)
Interleucina-8	S: 5'-TCTGCAGCTCTGTGTGAAGG-3'	(SEQ ID NO:7)
	A: 5'-CTTCAAAAAGTCTCCACAACC-3'	(SEQ ID NO:8)
Ligando 3 de quimiocina (CXC)	S: 5'-CCCACGCCACGCTCTCC-3'	(SEQ ID NO:9)
	A: 5'-TCCTGTGAGTTGGTGCTCC-3'	(SEQ ID NO:10)

Se fijaron las células con paraformaldehído al 4% (p/v) frío (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se utilizaron un aislado en el pase 0 (P0) (directamente después del aislamiento) y dos aislados en el pase 11 (P11), y fibroblastos (P11). Se realizó la inmunocitoquímica utilizando anticuerpos dirigidos contra los siguientes epítomos: vimentina (1:500, Sigma, St. Louis, MO), desmina (1:150; Sigma - generada contra conejo; ó 1:300; Chemicon, Temecula, CA – generada 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 humana Clase III; 1:100; DAKOCytomation, Carpinteria, CA). Además, se ensayaron los siguientes marcadores en células posparto en pase 11: anti-GRO alfa humana - PE (1:100; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), anti-GCP-2 humana (1:100; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), anti-receptor 1 de LDL oxidada humano (ox-LDL R1; 1:100; Santa Cruz Biotech) y anti-NOGO-A humana (1:100; Santa Cruz, Biotech).

Los cultivos se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una solución de bloqueo de proteínas que contenía PBS, suero de cabra al 4% (v/v) (Chemicon, Temecula, CA) y Triton al 0,3% (v/v) (Triton X-100; Sigma, St. Louis, MO) durante 30 minutos para acceder a los antígenos intracelulares. Cuando el epítomo de interés se encontraba en la superficie celular (CD34, ox-LDL R1), se omitió el Triton X-100 en todas las etapas del procedimiento a fin de evitar la pérdida del epítomo. Además, en los casos en que el anticuerpo primario se generó contra cabra (GCP-2, ox-LDL R1, NOGO-A), se utilizó durante todo el procedimiento suero de burro al 3% (v/v) en lugar de suero de cabra. A continuación se aplicaron a los cultivos los anticuerpos primarios, diluidos en solución de bloqueo, durante un período de 1 hora a temperatura ambiente. Se eliminaron las soluciones de anticuerpo primario y se lavaron los cultivos con PBS antes de la aplicación de las soluciones de anticuerpo secundario (1 hora a temperatura ambiente) que contenían el bloque junto con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón - Texas Red (1:250; Molecular Probes, Eugene, OR) y/o de cabra anti-IgG de conejo - Alexa 488 (1:250; Molecular Probes) o de burro anti-IgG de cabra - FITC (1:150, Santa Cruz Biotech). A continuación se lavaron los cultivos y se aplicó DAPI 10 micromolar (Molecular Probes) durante 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.

Después de la inmunotinción, se visualizó la fluorescencia utilizando un filtro de fluorescencia apropiado en un microscopio de epifluorescencia invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). En todos los casos, la tinción positiva representaba la señal de fluorescencia por encima de la tinción de control donde se siguió todo el procedimiento descrito anteriormente con la excepción de la aplicación de una solución de anticuerpo primario. Se capturaron imágenes representativas utilizando una cámara de vídeo digital en color y el software ImagePro (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para las muestras con triple tinción, cada imagen se obtuvo utilizando sólo un filtro de emisión a la vez. A continuación se prepararon los montajes en capas, utilizando el software Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA).

Las células adherentes en los 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 recolectaron, se

centrifugaron y se resuspendieron en FBS al 3% (v/v) en PBS a una concentración celular de 1×10^7 por mililitro. Se repartieron en tubos cónicos alícuotas de cien microlitros. Las células teñidas para los antígenos intracelulares se permeabilizaron con tampón Perm/Wash (BD Pharmingen, San Diego, CA). Se añadió el anticuerpo a las alícuotas según las especificaciones del fabricante y se incubaron las células en la oscuridad durante 30 minutos a 4°C. Después de la incubación, se lavaron las células con PBS y se centrifugaron para eliminar el exceso de anticuerpo. Las células que necesitaban un anticuerpo secundario se resuspendieron en 100 microlitros de FBS al 3%. Se añadió el anticuerpo secundario según las especificaciones del fabricante y se incubaron las células en la oscuridad durante 30 minutos a 4°C. Después de la incubación, se lavaron las células 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 mediante citometría de flujo. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: receptor 1 de LDL oxidada (sc-5813; Santa Cruz, Biotech), GROa (555042; BD Pharmingen, Bedford, MA), kappa de IgG1 de ratón (P-4685 y M-5284; Sigma), burro contra IgG de cabra (sc-3743; Santa Cruz, Biotech). El análisis de citometría de flujo se realizó con FACScalibur (Becton Dickinson San Jose, CA).

Los datos obtenidos de la PCR en tiempo real se analizaron por el método $\Delta\Delta CT$ y se expresaron en una escala logarítmica. Los niveles de expresión de reticulón y de receptor de LDL oxidada fueron más elevados en las células derivadas de tejido de cordón umbilical, en comparación con otras células. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de ligando 3 de CXC y GCP-2 entre las células derivadas de posparto y los controles. Los resultados de la PCR en tiempo real fueron confirmados mediante PCR convencional. La secuenciación de los productos de PCR validaba adicionalmente estas observaciones. No se encontraron diferencias significativas en el nivel de expresión del ligando 3 de CXC entre las células derivadas de posparto y los controles utilizando los cebadores de ligando 3 de CXC para PCR convencional mencionados anteriormente.

La producción de la citocina IL-8 en las posparto fue elevada tanto en las células derivadas de posparto con privación de suero como en las cultivadas en medio de crecimiento. Todos los datos de la PCR en tiempo real se validaron con PCR convencional y mediante la secuenciación de los productos de PCR.

Cuando se examinaron los sobrenadantes de las células cultivadas en medio sin suero para la presencia de IL-8, las mayores cantidades se detectaron en los medios provenientes de células umbilicales y algunos aislados de células de la placenta (Tabla 9). No se detectó IL-8 en el medio proveniente de fibroblastos dérmicos humanos.

Tabla 9

Cantidad de proteína IL-8 medida mediante ELISA	
Tipo de célula	IL-8
hFibro	ND
Aislado umb 1	2058,42 ± 144,67
Aislado umb 2	2368,86 ± 22,73
Valores picogramos/millón de células, n = 2, eem.; ND = no detectado	

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

Se ha establecido la concordancia entre los niveles de expresión génica medidos mediante micromatrices y PCR (tanto en tiempo real como convencional) para cuatro genes: receptor 1 de LDL oxidada, renina, reticulón e IL-8. La expresión de estos genes estaba regula diferencialmente a nivel del ARNm en las PPDC, estando la IL-8 también diferencialmente regulada a nivel de las proteínas. Se analizaron las células derivadas del tejido de 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 conservó hasta el pase 11.

EJEMPLO 6

Evaluación inmunológica *in vitro* de las células derivadas de posparto

Se evaluaron *in vitro* células derivadas de posparto (PPDC) para sus características inmunológicas en un esfuerzo para predecir la respuesta inmunológica, de haberla, que podrían inducir estas células tras el trasplante *in vivo*. Las PPDC se ensayaron mediante citometría de flujo para la presencia de HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86 y B7-H2. Estas proteínas son expresadas por las células presentadoras de antígeno (APC) y son necesarias para la estimulación directa de los linfocitos T CD4⁺ vírgenes (Abbas y Lichtman, CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY, 5ª Ed. (2003) Saunders, Filadelfia, p. 171). Las líneas celulares también se analizaron mediante

citometría de flujo para la expresión de HLA-G (Abbas y Lichtman, 2003, *supra*), CD178 (Coumans, *et al.*, (1999) Journal of Immunological Methods 224, 185-196) y PD-L2 (Abbas y Lichtman, 2003, *supra*; Brown, *et al.* (2003) The Journal of Immunology 170, 1257-1266.). Se piensa que la expresión de estas proteínas por las células que residen en los tejidos de la placenta interviene en el estado inmunoprivilegiado de los tejidos de la placenta en el útero. Para predecir el grado en que la placenta y las líneas celulares derivadas de tejido de cordón umbilical inducen una respuesta inmunitaria *in vivo*, se ensayaron las líneas celulares en una reacción linfocitaria mixta (MLR) unidireccional.

Las células se cultivaron hasta la confluencia en medio de crecimiento que contenía penicilina/estreptomina en matraces T75 (Corning, Corning, NY) recubiertos con gelatina al 2% (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, MO). Las células se recolectaron, se centrifugaron y se resuspendieron en FBS al 3% (v/v) en PBS a una concentración celular de 1×10^7 por mililitro. Se añadió el anticuerpo (Tabla 10) 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, se lavaron las células con PBS y se centrifugaron para eliminar el anticuerpo no unido. Se resuspendieron las células en quinientos microlitros de PBS y se analizaron mediante citometría de flujo utilizando un instrumento FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Tabla 10

Anticuerpos		
Anticuerpo	Fabricante	Número 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	Abeam (Cambridgeshire, UK)	ab 7904-100
CD 178	Santa Cruz (San Cruz, CA)	sc-19681
PD-L2	BD Pharmingen (San Diego, CA)	557846
IgG2a de ratón	Sigma (St. Louis, MO)	F-6522
Kappa de IgG1 de ratón	Sigma (St. Louis, MO)	P-4685

Se enviaron en hielo seco al CTBR (Senneville, Quebec) viales crioconservados de células derivadas de tejido de cordón umbilical del pase 10 marcados como línea celular A, para llevar a cabo una reacción linfocitaria mixta utilizando CTBR SOP N° CAC-031. Se recogieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de múltiples donantes voluntarios varones y mujeres. Se trataron con mitomicina C líneas celulares de posparto, PBMC autólogas y PBMC alogénicas estimuladoras (donante). Se añadieron células estimuladoras tratadas con mitomicina C y autólogas a PBMC respondedoras (destinatario) y se cultivaron durante 4 días. Después de la incubación, se añadió a cada muestra [³H]timidina y se cultivaron durante 18 horas. Después de recolectar las células, se extrajo el ADN marcado radiactivamente y se midió la incorporación de [³H]-timidina utilizando un contador de centelleo.

Se calculó el índice de estimulación para el donante alogénico (SIAD) como la proliferación media del receptor más el donante alogénico tratado con mitomicina C dividido por la proliferación inicial del receptor. El índice de estimulación de las PPDC se calculó como la media de proliferación del receptor más la línea celular de posparto tratada con mitomicina C dividido por la proliferación inicial del receptor.

Se cribaron seis donantes de sangre humanos voluntarios para identificar un solo donante alogénico que presentara una respuesta de proliferación robusta en una reacción linfocitaria mixta con los otros cinco donantes de sangre. Se seleccionó este donante como donante alogénico control positivo. Los cinco donantes de sangre restantes se seleccionaron como destinatarios. El donante alogénico control positivo y las líneas celulares de placenta se trataron con mitomicina C y se cultivaron en una reacción linfocitaria mixta con los cinco receptores alogénicos individuales. Las reacciones se realizaron por triplicado utilizando dos placas de cultivo celular con tres receptores por placa (Tabla 11). El índice medio de estimulación varió entre 6,5 (placa 1) y 9 (placa 2) y los controles positivos donante alogénico variaron entre 42,75 (placa 1) y 70 (placa de 2) (Tabla 12).

Tabla 11

Datos de la reacción linfocitaria mixta - línea celular A (cordón umbilical)									
DPM para el ensayo de proliferación									
ID de placa: Placa 1									
Número de análisis	Sistema de cultivo	Repeticiones			Media	DE	CV		
		1	2	3					
IM04-2478	Medida inicial de la proliferación del receptor	1074	406	391	623,7	390,07	62,5		
	Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	672	510	1402	861,3	475,19	55,2		
	Donante alogénico MLR IM04-2477 (tratado con mitomicina C)	43777	48391	38231	43466,3	5087,12	11,7		
	MLR con línea celular (célula tratada con mitomicina C, tipo A)	2914	5622	6109	4881,7	1721,36	35,3		
SI (donante)					70				
SI (línea celular)					8				

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

5	IM04-2479	Medida inicial de la proliferación del receptor	530	508	527	521,7	11,93	2,3
		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	701	567	1111	793,0	283,43	35,7
10		Donante alogénico MLR IM04-2477 (tratado con mitomicina C)	25593	24732	22707	24344,0	1481,61	6,1
		MLR con línea celular (célula tratada con mitomicina C, tipo A)	5086	3932	1497	3505,0	1832,21	52,3
15	SI (donante) SI (línea celular)					47 7		
20	IM04-2480	Medida inicial de la proliferación del receptor	1192	854	1330	1125,3	244,90	21,8
		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	2963	993	2197	2051,0	993,08	48,4
25		Donante alogénico MLR IM04-2477 (tratado con mitomicina C)	25416	29721	23757	26298,0	3078,27	11,7
		MLR con línea celular (célula tratada con mitomicina C, tipo A)	2596	5076	3426	3699,3	1262,39	34,1
30	SI (donante) SI (línea celular)					23 3		
35	IM04-2481	Medida inicial de la proliferación del receptor	695	451	555	567,0	122,44	21,6
		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	738	1252	464	818,0	400,04	48,9
40		Donante alogénico MLR IM04-2477 (tratado con mitomicina C)	13177	24885	15444	17835,3	6209,52	34,8
		MLR con línea celular (célula tratada con mitomicina C, tipo A)	4495	3671	4674	4280,0	534,95	12,5
45	SI (donante) SI (línea celular)					31 8		
ID de placa: Placa 2								
50	IM04-2482	Medida inicial de la proliferación del receptor	432	533	274	413.0	130.54	31.6
		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	1459	633	598	896.7	487.31	54.3
55		Donante alogénico MLR IM04-2477 (tratado con mitomicina C)	24286	30823	31346	28818.3	3933.82	13.7
		MLR con línea celular (célula tratada con mitomicina C, tipo A)	2762	1502	6723	3662.3	2724.46	74.4
60	SI (donante) SI (línea celular)					70 9		

65

5	IM04-2477 (donante allogénico)	Medida inicial de la proliferación del receptor Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	312	419	349	360,0	54,34	15,1
			567	604	374	515,0	123,50	24,0
10	Línea celular tipo A	Medida inicial de la proliferación del receptor Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	5101	3735	2973	3936,3	1078,19	27,4
			1924	4570	2153	2882,3	1466,04	50,9

Tabla 12

20	Índice medio de estimulación de células derivadas de tejido de cordón umbilical y un donante allogénico en una reacción linfocitaria mixta con cinco receptores allogénicos individuales.		
	Índice medio de estimulación		
		Destinatario	Umbilical
	Placa 1 (receptores 1-4)	42,75	6,5
Placa 2 (receptores 5)	70	9	

Los histogramas de las células derivadas de tejido de cordón umbilical analizadas mediante citometría de flujo muestran expresión negativa de HLA-DR, DP, DQ, CD80, CD86 y B7-H2, como indicaba el valor de fluorescencia coherente con el control IgG, lo que indica que las líneas de células umbilicales carecen de las moléculas de superficie celular necesarias para estimular directamente los linfocitos T CD4⁺. Los histogramas de las células derivadas de tejido de cordón umbilical analizadas mediante citometría de flujo muestran expresión positiva de PD-L2, como indicaba el aumento del valor de fluorescencia con respecto al control IgG, y la expresión negativa de CD178 y HLA-G, como indicaba el valor de fluorescencia coherente con el control IgG.

En las reacciones linfocitarias mixtas llevadas a cabo con las líneas celulares derivadas de tejido de cordón umbilical el índice medio de estimulación varió entre 6,5 y 9, y el de los controles allogénicos positivos varió entre 42,75 y 70. Las líneas celulares derivadas de tejido de cordón umbilical fueron negativas para la expresión de las proteínas estimuladoras HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86 y B7-H2, según se mide mediante citometría de flujo. Las líneas celulares derivadas de tejido de cordón umbilical fueron negativas para la expresión de las proteínas inmunomoduladoras HLA-G y CD178 y positivas para la expresión de PD-L2, según se mide mediante citometría de flujo. Las PBMC de donantes allogénicos contienen células presentadoras de antígeno que expresan HLA-DR, DQ, CD8, CD86 y B7-H2, permitiendo de este modo la estimulación de los linfocitos T CD4⁺ vírgenes. La ausencia de moléculas de superficie de células presentadoras de antígeno en las células derivadas de tejido de cordón umbilical y de placenta necesarias para la estimulación directa de los linfocitos T CD4⁺ vírgenes y la presencia de PD-L2, una proteína inmunomoduladora, puede explicar el bajo índice de estimulación presentado por estas células en una MLR en comparación con los controles allogénicos.

EJEMPLO 7

Secreción de factores tróficos por las células derivadas de tejido de cordón umbilical

Se midió la secreción de factores tróficos seleccionados a partir de células derivadas de tejido de cordón umbilical. Los factores seleccionados para la detección incluían: (1) los conocidos por tener actividad angiogénica, tal como el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (Rosen *et al.* (1997) Ciba Found. Symp. 212:215-26), proteína 1 quimiotáctica para monocitos (MCP -1) (Salcedo *et al.* (2000). Blood 96:34-40), interleucina-8 (IL-8) (Li *et al.* (2003). J. Immunol. 170:3369-76), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Hughes *et al.* (2004). Ann. Thorac. Surg. 77:812-8), metaloproteínasa de matriz 1 (TIMP1), angiopoyetina 2 (ANG2), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-bb), trombopoyetina (TPO), factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF), factor alfa derivado del estroma 1 (SDF-1 alfa); (2) los conocidos por tener actividad neurotrófica/neuroprotectora, tal como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Cheng *et al.* (2003) Dev. Biol. 258: 319-33), interleucina-6 (IL-6), proteína 2 quimiotáctica para granulocitos (GCP-2), factor de crecimiento transformante beta 2 (TGFbeta2); y (3) los conocidos por tener actividad quimiocina, tal como la proteína 1 alfa inflamatoria de macrófagos (MIP1a), proteína 1 beta inflamatoria de macrófagos (MIP1b), quimioatrayente para monocitos 1 (MCP-1), RANTES (expresada y secretada por el linfocito T normal en función de su grado de activación), I309, quimiocina regulada por el timo y la activación (TARC), eotaxina, quimiocina derivada de macrófagos (MDC), IL-8.

Se cultivaron las células del cordón umbilical así como fibroblastos humanos derivados de prepucio neonatal humano en medio de crecimiento con penicilina/estreptomina en matraces T75 recubiertos con gelatina. Las células se crioconservaron en el pase 11 y se almacenaron en nitrógeno líquido. Después de descongelar las

células, se añadió a las células medio de crecimiento, seguido de la transferencia a un tubo de centrifuga de 15 mililitros y centrifugación de las células a 150 x g durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante. Se resuspendió el sedimento celular en 4 mililitros de medio de crecimiento y se contaron las células. Se sembraron las células a 375.000 células/matraz de 75 cm² que contenía 15 mililitros de medio de crecimiento y se cultivaron durante 24 horas. El medio se cambió a un medio sin suero (DMEM-bajo contenido en glucosa (Gibco), albúmina de suero bovino al 0,1% (p/v) (Sigma), penicilina/estreptomicina (Gibco)) durante 8 horas. Se recogió el medio acondicionado sin suero al final de la incubación por centrifugación a 14.000 x g durante 5 minutos y se almacenó a -20°C. Para hacer una estimación del número de células en cada matraz, se lavaron las células con PBS y se desprendieron utilizando 2 mililitros de tripsina/EDTA. La actividad de la tripsina se inhibió añadiendo 8 mililitros de medio de crecimiento. Las células se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos. Se aspiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1 mililitro de medio de crecimiento. Se hizo una estimación del número de células mediante un hemocitómetro.

Las células se cultivaron a 37°C en dióxido de carbono al 5% y oxígeno atmosférico. Las células derivadas de placenta (lote 101503) también se cultivaron en oxígeno al 5% o beta-mercaptoetanol (BME). La cantidad de MCP-1, IL-6, VEGF, SDF-1 alfa, GCP- 2, IL-8 y TGF-beta 2 producida por cada muestra de células se midió mediante un ensayo ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN). Todos los ensayos se realizaron según las instrucciones del fabricante.

Las quimiocinas (MIP1a, MIP1b, MCP-1, RANTES, I309, TARC, eotaxina, MDC, IL8), BDNF y los factores angiogénicos (HGF, KGF, bFGF, VEGF, TIMP1, ANG2, PDGF-bb, TPO, HB-EGF se midieron utilizando matrices de proteinoma SEARCHLIGHT® (Pierce Biotechnology Inc.). Las matrices de proteinoma son ensayos ELISA de tipo sándwich multiplexados para la medición cuantitativa de dos a 16 proteínas por pocillo. Las matrices se producen puntear un patrón 2 x 2, 3 x 3 ó 4 x 4 de cuatro a 16 diferentes anticuerpos de captura en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Siguiendo un procedimiento ELISA de tipo sándwich, se obtiene una imagen de toda la placa para capturar la señal quimioluminiscente generada en cada punto dentro de cada pocillo de la placa. La cantidad de señal generada en cada punto es proporcional a la cantidad de proteína diana en la muestra o estándar original.

MCP-1 e IL-6 fueron secretadas por las células derivadas de tejido de cordón umbilical y los fibroblastos dérmicos (Tabla 13). SDF-1 alfa fue secretada por los fibroblastos. GCP-2 e IL-8 fueron secretadas por las células derivadas de tejido de cordón umbilical cultivadas en presencia de BME u O₂ al 5%. GCP-2 también fue secretada por los fibroblastos humanos. No pudo detectarse TGF-beta2 mediante el ensayo de ELISA.

Tabla 13

Resultados del ensayo ELISA							
	MCP-1	IL-6	VEGF	SDF-1 α	GCP-2	IL-8	TGF- β 2
Fibroblasto	17 \pm 1	61 \pm 3	29 \pm 2	19 \pm 1	21 \pm 1	ND	ND
Cordón umbilical (022803)	1150 \pm 74	4234 \pm 289	ND	ND	160 \pm 11	2058 \pm 145	ND
Cordón umbilical (071003)	2794 \pm 84	1356 \pm 43	ND	ND	2184 \pm 98	2369 \pm 23	ND

Los valores presentados son picogramos/mililitro/millón de células (n=2, eem); ND = No Detectado

TIMP1, TPO, KGF, HGF, FGF, HBEGF, BDNF, MIP1b, MCP1, RANTES, 1309, TARC, MDC e IL-8 fueron secretadas a partir de células derivadas de tejido de cordón umbilical (Tablas 14 y 15). No se detectaron Ang2, VEGF o PDGF-bb.

Tabla 14

Resultados del ensayo ELISA multiplexado SearchLight®										
	TIMP1	ANG2	PDGF-bb	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

hFB = fibroblastos humanos, U1 = células derivadas de tejido de cordón umbilical (022803), U3 = células derivadas de tejido de cordón umbilical (071003), ND = No detectado.

Tabla 15

Resultados del ensayo ELISA multiplexado SearchLight®									
	MIP1a	MIP1b	MCP1	RANTES	1309	TARC	Eotaxina	MDC	IL8
hFB	ND	ND	39,6	ND	ND	0,1	ND	ND	204,9
P1	79,5	ND	228,4	4,1	ND	3,8	12,2	ND	413,5
U1	ND	8,0	1694,2	ND	22,4	37,6	ND	18,9	51930,1
P3	ND	ND	102,7	ND	ND	0,4	ND	ND	63,8
U3	ND	5,2	2018,7	41,5	11,6	21,4	ND	4,8	10515,9

hFB = fibroblastos humanos, U1 = células derivadas de tejido de cordón umbilical (022803), U3 = células derivadas de tejido de cordón umbilical (071003), ND = No detectado

Las células derivadas de tejido de cordón umbilical secretaron varios factores tróficos. Algunos de estos factores tróficos, tales como HGF, bFGF, MCP-1 e IL-8, desempeñan un papel importante en la angiogénesis. Otros factores tróficos, tales como BDNF e IL-6, tienen un papel importante en la regeneración neural.

EJEMPLO 8

Inhibición de la expresión inducida por IFN-gamma de HLA-DR,DP,DQ en células derivadas de tejido de cordón umbilical humano multiplicadas mediante inhibidores de HMG-CoA reductasa

Se sembraron células derivadas de tejido de cordón umbilical humano multiplicadas en cultivo (022803 P4) en placas de cultivo de tejidos de 6 pocillos y se cultivaron en medio Eagles modificado de Dulbecco (DMEM)-bajo contenido en glucosa, suero bovino fetal al 15% (FBS), penicilina/estreptomicina (P/S), betamercaptoetanol (BME) hasta aproximadamente el 70% de confluencia. A continuación se trataron las células con medios que contenían 10 µM del respectivo inhibidor de HMG-CoA reductasa (ácido de simvastatina (Alexis Biochemicals, Lausen, Suiza) formulado como reactivos de reserva 10 mM en DMSO) o vehículo DMSO - 0,1% (Sigma, St. Louis, MO) y se incubaron durante la noche. Los medios se retiraron por aspiración y se reemplazaron con medios que contenían 500 U/ml de rhIFN-gamma (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ) y 10 µM del respectivo inhibidor de HMG-CoA reductasa y se incubaron durante 3 días. El tercer día, se recolectaron con tripsina las células.

Las células recolectadas se lavaron una vez con PBS y se resuspendieron en 100 µl de FBS al 3% en PBS con 20 µl de HLA-DR,DP,DQ marcado con FITC (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) o anticuerpo IgG marcado con FITC (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) y se incubaron durante una hora. Las células se lavaron una vez en PBS y se resuspendieron en 500 µl de PBS y se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (BS Biosciences, Franklin Lakes, NJ).

Tabla 16

Expresión de HLA-DR,DP,DQ de hUTC según se mide mediante los valores de intensidad de fluorescencia FITC de las tratadas previamente con inhibidor de HMG-CoA reductasa y tratadas adicionalmente con citocina inflamatoria IFN-gamma						
Tratamiento con inhibidor de HMG-CoA reductasa	Control IgG		Tratada con IFN-gamma		Sin tratamiento con citocina	
	Media	Desv. est.	Media	Desv. est.	Media	Desv. est.
Sin tratar	4,88	5,12	274,23	219,04	5,56	8,97
Vehículo de control DMSO al 0,1%	4,09	5,67	294,08	257,08	5,54	5,46
Simvastatina	4,4	2,38	5,57	3,98	5,66	3,25

Como se muestra en la Tabla 16, las células derivadas de tejido de cordón umbilical humano sin tratar y con vehículo de control DMSO al 0,1% incubadas con la citocina inflamatoria IFN-gamma mostraron un aumento de la expresión de HLA-DR,DP,DQ como se observa por el aumento de la fluorescencia detectada mediante citometría de flujo. Las células derivadas de tejido de cordón umbilical humano tratadas previamente con inhibidor de HMG-CoA reductasa e incubadas posteriormente con IFN-gamma mostraron una expresión de HLA-DR,DP,DQ similar a las no tratadas y los vehículos de control.

Estos datos indican que la HMG-CoA reductasa inhibe la expresión mediada por citocinas inflamatorias de HLA-DR,DP,DQ en las células derivadas de tejido de cordón umbilical humano.

EJEMPLO 9

Eficacia renoprotectora de las células derivadas de tejido de cordón umbilical humano en un modelo de roedor de insuficiencia renal aguda de origen medicamentoso

Se adquirieron cincuenta y ocho ratones C57BL/6J hembra de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine). La Tabla 17 describe el diseño experimental que se implementó en este estudio.

Tabla 17

Diseño experimental. Células madre mesenquimales de ratón (mMSC). Células madre mesenquimales humanas (hMSC). Vehículo de control solución salina equilibrada de Hanks (HBSS). Número de células viables inyectadas (dosis celular). Células derivadas de tejido de cordón umbilical humano (hUTC)				
Grupo de tratamiento	Número de animales	Sexo	Material de ensayo	Dosis celular
1	14	Hembra	HBSS	NA
2	10	Hembra	mMSC	$0,2 \times 10^6$
3	10	Hembra	hMSC	$0,2 \times 10^6$
4	10	Hembra	hUTC	$0,2 \times 10^6$
5	14	Hembra	hUTC	$0,4 \times 10^6$

Se indujo la insuficiencia renal aguda en los ratones utilizando dos inyecciones subcutáneas de *cis*-diaminodicloroplatino (cisplatino) (Sigma Co. N° cat. P4394) a una concentración de 10 mg/kg cada una, seguido de una infusión de células o solución salina equilibrada de Hanks (HBSS), sin Ca^{++}/Mg^{++} (Invitrogen, N° cat. 14025, N° lote 1300696) de veinticuatro a cuarenta y ocho horas después de la inyección inicial de cisplatino. La Figura 1 muestra la secuencia de eventos para la ejecución de este estudio.

Se aislaron hUTC en pase 10 (N° lote 120304) y se multiplicaron y crioconservaron a $< -120^{\circ}C$ (fase de vapor de nitrógeno líquido). Siguiendo las instrucciones del fabricante, se multiplicaron las hMSC (Cambrex (Lonza), Walkersville, MD) N° cat. PT-2501, N° lote 4F1560) hasta el pase 6 y a continuación se crioconservaron. Se aislaron en el momento MSC de ratón (mMSC) y se multiplicaron. En resumen, se lavó abundantemente médula ósea de ratón C57BL/6J de la tibia y el fémur utilizando una aguja de calibre 25. Se cultivó la médula ósea a $1-2 \times 10^6$ células/cm² en medio de Dulbecco modificado por Iscove que se complementó con suero fetal al 10%. Se eliminaron las células no adherentes y se intercambiaron los medios 48-72 horas después de la siembra, así como cada cuatro días posteriormente. Cuando los matraces de cultivo de tejidos estaban cerca de la confluencia, se eliminaron enzimáticamente del matraz de cultivo las mMSC. Después de dos pases, se recolectaron las mMSC y se prepararon para el trasplante. Tanto las hUTC como las hMSC presentaban un cariotipo normal y estaban desprovistas de contaminación por micoplasmas y patógenos.

En el momento de la inyección de células, se descongelaron las hUTC y las hMSC a $37^{\circ}C$ y se lavaron dos veces con HBSS. Se contaron las células mediante un hemocitómetro y se determinó la viabilidad celular mediante exclusión con colorante azul de tripano. Las células se reconstituyeron a una concentración de $0,2 \times 10^6/200 \mu l$ de HBSS ó $0,4 \times 10^6$ células/200 μl de HBSS. Las células suspendidas en HBSS o el HBSS en solitario (como control negativo) se inyectaron en la vena facial anterior utilizando una jeringa de 1 ml provista de una aguja de calibre 27.

Para determinar la tasa de supervivencia de los animales, se dividió el número de animales vivos el día 7 después del trasplante de las células por el número inicial de animales en el grupo de tratamiento. Como se muestra en la Tabla 18 y en la Figura 2, el tratamiento con vehículo HBSS dio como resultado sólo un 43% de animales supervivientes el día 7 después del trasplante de las células. Sin embargo, el tratamiento con mMSC y con hMSC dio como resultado un 90% de supervivencia de los animales. La inyección de hUTC a menor dosis ($0,2 \times 10^6$ células) dio como resultado un 70% de animales supervivientes el día 7, y el tratamiento con hUTC a mayor dosis ($0,4 \times 10^6$ células) dio como resultado sólo un 50% de supervivencia de los animales.

Tabla 18

Tasa de supervivencia. El día 7 después del trasplante de las células, se determinó el porcentaje de animales supervivientes		
Tratamiento	Dosis	Porcentaje de supervivencia
1	NA	43
2	$0,2 \times 10^6$	90
3	$0,2 \times 10^6$	90
4	$0,2 \times 10^6$	70
5	$0,4 \times 10^6$	50

Se extrajeron muestras de sangre (50 μl) de la vena de la cola antes de las inyecciones de cisplatino (día -1) y los días 3, 5 y 7 después del trasplante de las células. Se preparó suero a partir de las muestras de sangre y se almacenó a $-80^{\circ}C$ en tubos tratados con EDTA hasta el momento del análisis. Se retiró el alimento a todos los animales, durante la noche, antes de la extracción de las muestras de sangre. Se llevaron a cabo mediciones de nitrógeno ureico en sangre (BUN) mediante un analizador de química COBAS Mira (Roche, Suiza). La creatinina sérica (SCr) se analizó mediante un analizador de química Advia 1650 (Bayer, Pittsburgh, PA).

Antes de la lesión, las HBSS, mMSC, hMSC, hUTC a menor dosis y hUTC a mayor dosis mostraron valores de BUN normales de 16,89 mg/dl, 17,19 mg/dl, 17,21 mg/dl, 17,47 mg/dl, 17,33 mg/dl respectivamente (Tabla 19, Figura 3). Sin embargo, el quinto día todos los grupos de tratamiento mostraron niveles de BUN elevados. El tratamiento con HBSS dio como resultado un BUN medio de 64,37 mg/dl y el tratamiento con mMSC 58,96 mg/dl. Sin embargo, tanto el tratamiento con hMSC y con hUTC a menor dosis dio como resultado valores de BUN reducidos de 40,44 mg/dl y 51,32 mg/dl, respectivamente, mientras que un tratamiento con hUTC a mayor dosis mostró un BUN elevado de 97,28 mg/dl. No se observaron diferencias estadísticas entre los grupos de tratamiento y de vehículo. Esto se debía a la variabilidad que se observa por lo general con las mediciones de BUN. Las mediciones del día 7 mostraron datos de tendencia similar, sin embargo se observó una drástica reducción en los valores de BUN del grupo de vehículo. Esto hace que sea difícil evaluar con precisión los efectos del tratamiento con células sobre la función renal a los 7 días después del trasplante.

Tabla 19

Día: BUN (mg/dl)		Mediciones de BUN							
		Grupo de tratamiento: 1				Grupo de tratamiento: 2			
		-1	3	5	7	-1	3	5	7
		18,85	35,20	32,83	41,68	11,22	37,57	55,84	66,73
		20,75	41,61	78,62	45,96	22,70	33,80	79,56	111,80
		15,85	28,59	32,88	51,88	17,57	46,28	97,34	121,74
		15,91	52,75	112,33	28,77	19,55	26,73	37,88	60,97
		21,02	40,60	57,43	24,39	17,81	34,15	49,94	116,65
		14,36	42,72	46,98	30,67	14,27	48,59	89,96	23,68
		17,45	30,83	39,09	41,68	19,63	17,98	11,54	74,05
		19,99	35,22	80,53	45,96	17,17	27,27	50,23	78,61
		19,69	28,38	88,69		15,95	45,71	58,37	25,30
		14,27	25,75	120,36		15,99			
		12,16	59,32	77,01					
		16,23	38,21	35,80					
		15,15	31,66	34,25					
		15,15							
	Promedio	16,92	37,76	64,37	38,87	17,19	35,34	58,96	75,50
	Est:	2,74	9,80	30,75	9,74	3,15	10,32	26,74	36,49
	EEM	0,71	2,72	8,53	3,44	1,00	3,44	8,91	12,16
Día: BUN (mg/dl)		Grupo de tratamiento: 3				Grupo de tratamiento: 4			
		-1	3	5	7	-1	3	5	7
		15,77	19,07	20,60	41,86	14,52	35,76	72,09	108,61
		17,79	24,94	36,81	38,75	17,24	34,48	68,90	33,84
		16,59	25,75	32,03	44,21	14,23	56,19	62,37	35,62
		17,09	31,60	40,95	117,98	17,65	27,25	23,32	23,39
		18,46	37,49	51,86	43,78	16,83	24,76	30,53	111,16
		16,72	38,31	69,33	39,17	15,39	20,93	21,88	
		15,76	34,87	47,99	24,02	18,23	34,01	89,88	
		17,55	17,22	17,55	157,38	20,76	33,72	73,36	
		17,28	34,23	49,43	28,04	20,14	46,90	65,91	
		19,05	29,33	37,84		19,69			
	Promedio	17,21	29,28	40,44	59,47	17,47	34,89	51,32	62,52
	Est:	1,07	7,39	15,32	45,94	2,30	10,94	28,43	43,50
	EEM	0,34	2,34	4,84	15,31	0,73	3,65	9,48	19,45
Día: BUN (mg/dl)		Grupo de tratamiento: 5							
		-1	3	5	7				
		15,78	104,42	92,85	222,03				
		15,22	44,20	92,10	47,15				
		14,34	42,41	53,20	74,12				
		11,70	27,39	29,54					
		22,54	28,69	118,43					
		19,44	43,17	92,68					
		18,72	55,16	113,65					
		18,83	33,37	43,05					
		21,28	142,07	54,15					
		13,02	26,43	111,03					

		17,45	25,46	269,38	
		18,56	78,26		
		18,41			
		17,30			
	Promedio	17,33	54,25	97,28	114,43
	Est:	3,04	36,41	64,75	94,15
	EEM	0,81	10,51	19,52	54,36

La Tabla 20 y la Figura 4 muestran las mediciones de SCr de las muestras de suero del día 5. El tratamiento con HBSS y mMSC dio como resultado valores medios de creatinina de 0,74 mg/dl y 0,66 mg/dl, respectivamente. Se observó una reducción estadísticamente significativa en la SCr después del tratamiento con hMSC o hUTC a menor dosis ($P < 0,03$). El tratamiento con hMSC dio como resultado un valor medio de SCr de 0,47 mg/dl y el tratamiento con hUTC a menor dosis dio como resultado un valor medio de SCr de 0,57 mg/dl.

Tabla 20

Creatinina sérica. La Crs se midió el día 5 después del trasplante de las células. Desviación estándar (est.). Error estándar de la media (EEM)						
<u>Grupo de tratamiento</u>	<u>Material de ensayo</u>	<u>Creatinina mg/dl</u>	<u>Media</u>	<u>Est.</u>	<u>EEM</u>	<u>Valor de p</u>
1	HBSS	0,64	0,74	0,09	0,04	na
	HBSS	0,72				
	HBSS	0,72				
	HBSS	0,89				
	HBSS	0,73				
2	mMSC	0,64	0,66	0,10	0,05	0,213
	mMSC	0,72				
	mMSC	0,72				
	mMSC	0,48				
	mMSC	0,72				
3	hMSC	0,24	0,47	0,21	0,09	0,008
	hMSC	0,27				
	hMSC	0,56				
	hMSC	0,56				
4	hUTC	0,64	0,57	0,08	0,03	0,028
	hUTC	0,45				
	hUTC	0,56				
	hUTC	0,64				
5	hUTC	1,28	0,68	0,38	0,17	0,789
	hUTC	0,26				
	hUTC	0,48				
	hUTC	0,72				

El día 7 después del trasplante de las células, se sacrificaron dos ratones por grupo de tratamiento y se fijaron los tejidos mediante perfusión transcardíaca con solución salina, seguido de perfusión e inmersión en paraformaldehído al 4%. Se extirparon los riñones de los ratones y se procesaron para la histología. A continuación se evaluaron los cortes teñidos con H&E para la lesión histológica. Dos patólogos entrenados realizaron evaluaciones con enmascaramiento y puntuaron el grado de degeneración tubular renal.

Se midió cualitativamente la necrosis tubular en los cortes histológicos de animales tratados con HBSS, hMSC y hUTC a menor dosis. Se puntuó la degeneración tubular en una escala que iba de 1 a 4 (1 = daño mínimo, 2 = daño leve, 3 = daño moderado, 4 = daño grave). Como se muestra en la Tabla 21 y en la Figura 5, el tratamiento con vehículo y con hMSC dio como resultado una degeneración tubular leve, con una puntuación media de lesión de 2,5. Sin embargo, un tratamiento con hUTC a menor dosis dio como resultado daño tubular mínimo con una puntuación media de lesión de 1,9, que indicaba el potencial renoprotector de las hUTC.

Tabla 21

Evaluación de la lesión histológica. El grado de degeneración tubular fue puntuado de forma independiente, por dos patólogos (Patólogo A, B). Los patólogos desconocían la asignación de los grupos de tratamiento						
	Vehículo		hMSC		hUTC (dosis baja)	
Número de animal	1	2	3	4	5	6
Patólogo A	3	3	3	2	2,5	2
Patólogo B	2	2	3	2	1	2
Puntuación media	Leve (2,5)		Leve (2,5)		Mínima (1,9)	
Los valores representan las puntuaciones de la lesión utilizando la siguiente escala de evaluación, 1 = mínima, 2 = leve, 3 = moderada, 4 = grave.						

Los datos muestran que las hUTC y las hMSC protegen los riñones de la nefrotoxicidad inducida por cisplatino. Este estudio utiliza una concentración muy alta de cisplatino y por lo tanto representa un modelo de nefrotoxicidad grave. En estudios futuros se utilizará una dosis de cisplatino subletal menor. Este modelo de nefrotoxicidad de menor dosis será más representativo del tipo de lesión observada en los seres humanos. Además, la administración intravenosa de las hUTC tendrá lugar al menos veinticuatro horas después de la infusión de cisplatino. Esto asegurará que los niveles de cisplatino en sangre sean muy bajos y haya menos probabilidad de que ejerzan efectos negativos en las hUTC.

El tratamiento de los ratones lesionados con $0,2 \times 10^6$ hUTC dio como resultado una mayor tasa de supervivencia, una reducción del 23% en la SCr y menor degeneración tubular en comparación con los animales tratados con vehículo. Estos hallazgos significativos indican que las hUTC podrían proteger al riñón frente a la insuficiencia renal aguda de origen medicamentoso.

EJEMPLO 10

Evaluación de la eficacia renoprotectora de las células derivadas de tejido de cordón umbilical humano en un modelo de rata de nefrotoxicidad inducida por cisplatino

Se indujo nefrotoxicidad en treinta y nueve ratas macho Sprague Dawley. Se administró (6 mg/kg) cis-diaminodicloroplatino (cisplatino) (Sigma Co. N° cat. P4394, N° lote 076K1697) mediante inyección intraperitoneal (IP) veinticuatro horas antes de la administración de las células. Se administró a los animales un volumen de 5 ml/kg, y los niveles de dosis se basaron en el peso corporal recogido más recientemente.

Se aislaron hUTC (N° lote Q091506) en fase 10, se multiplicaron y se crioconservaron a $< -120^\circ\text{C}$ (fase de vapor de nitrógeno líquido). Las hUTC presentaban un cariotipo normal y estaban desprovistas de contaminación por micoplasmas y patógenos.

En el momento del trasplante de células, se descongelaron las hUTC a 37°C , se lavaron dos veces con HBSS y se resuspendieron en HBSS a la concentración apropiada. Se administró a los animales una vez, el día 1, veinticuatro horas después de la administración de cisplatino, mediante inyección intravenosa (IV), el vehículo (solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) sin $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ (Invitrogen, N° cat. 14025, N° lote 1226569)) o hUTC a un volumen de 2 ml y una velocidad de infusión aproximada de dos minutos. Véase la Tabla 22 para las asignaciones de los grupos de tratamiento. El grupo 1 recibió sólo vehículo y los grupos 2-4 recibieron hUTC a niveles de $0,3 \times 10^6$, 1×10^6 y 3×10^6 células por animal. Los animales tenían aproximadamente 7-8 semanas de edad en el momento de la dosificación.

Tabla 22

Diseño experimental				
Grupo de tratamiento	Número de animales	Sexo	Material de ensayo	Dosis celular
1	10	Macho	Vehículo	NA
2	10	Macho	hUTC	$0,3 \times 10^6$
3	9	Macho	hUTC	$1,0 \times 10^6$
4	10	Macho	hUTC	$3,0 \times 10^6$

Las muestras de sangre se recogieron antes del tratamiento con la célula o el vehículo (día 1) y los días 4, 6 y 8 después del tratamiento con cisplatino mediante punción de la vena de la cola. Las muestras de sangre se procesaron para el suero, y a continuación se midieron el BUN y la SCr mediante un analizador de inmunoquímica Olympus AU640.

Se evaluaron las muestras de sangre para el BUN y la SCr los días 1, 4, 6 y 8 (Tabla 23, Figura 6, Figura 7). Se administró cisplatino a todos los animales (Grupos 1-4) y mostraron niveles iniciales similares, con un notable aumento en los niveles medios de BUN y SCr para todos los grupos del día 1 al día 4. Todos los grupos de

tratamiento mostraron un marcado aumento en los niveles de BUN y de SCr, variando los niveles medios del grupo de tratamiento de 12-13 mg/dl (BUN) y 0,3 mg/dl (SCr) el día 1 a 62-68 mg/dl (BUN) y 1,8-2,2 mg/dl (SCr) el día 4. Sin embargo, los animales con vehículo de control (Grupo 1) mostraron una media menor de BUN y SCr para el día 6 ($34 \pm 10,4$ mg/dl y $0,8 \pm 0,2$ mg/dl, respectivamente), que se redujeron adicionalmente para el día 8, acercándose a los niveles iniciales ($19 \pm 4,1$ mg/dl y $0,5 \pm 0,1$ mg/dl, respectivamente). Esto sugiere que la nefrotoxicidad fue transitoria y comenzó a revertir para el día 6 siendo los niveles de BUN y SCr casi los iniciales para el día 8. Del mismo modo, los niveles de BUN y SCr para los animales a los que se administró hUTC (Grupos 2-4) fueron comparables o ligeramente inferiores a los de los animales con vehículo de control (Grupo 1). Parecía haber poco efecto del tratamiento con células a una dosis de $0,3 \times 10^6$ (Grupo 2) y 1×10^6 células/animal (Grupo 3) los días 6 y 8. Sin embargo, el tratamiento con hUTC a una dosis de 3×10^6 células/animal (Grupo 4) dio como resultado una disminución significativa en los valores medios de BUN y SCr el día 6 ($20 \pm 6,1$ mg/dl y $0,5 \pm 0,12$ mg/dl, respectivamente).

Tabla 23

Análisis químico del suero					
BUN					
Grupo de tratamiento		Día 1	Día 4	Día 6	Día 8
1 - vehículo	Media (mg/dl)	13,5	64,5	36,5	20
	EEM (mg/dl)	0,99	4,36	3,29	1,45
2 - $0,3 \times 10^6$	Media	12	57	20	16
	EEM	0,51	4,22	3,87	1,54
3 - $1,0 \times 10^6$	Media	11,5	66	33	19
	EEM	0,62	4,47	7,85	2,19
4 - $3,0 \times 10^6$	Media	13	57	18	14,5
	EEM	0,77	6,47	1,93	1,12
SCr					
Grupo de tratamiento		Día 1	Día 4	Día 6	Día 8
1 - vehículo	Media (mg/dl)	0,3	2,05	0,8	0,5
	EEM (mg/dl)	0,01	0,16	0,05	0,03
2 - $0,3 \times 10^6$	Media	0,3	1,6	0,6	0,4
	EEM	0,01	0,13	0,06	0,04
3 - $1,0 \times 10^6$	Media	0,3	2,4	0,7	0,5
	EEM	0,02	0,17	0,11	0,04
4 - $3,0 \times 10^6$	Media	0,3	1,6	0,5	0,35
	EEM	0,03	0,23	0,04	0,03

Antes del tratamiento con células y los días 4, 6 y 8 (antes de la necropsia), se colocó a los animales en jaulas de metabolismo y se recogieron en hielo muestras de orina, después de un período de aproximadamente 8-10 horas. Se midió el volumen de orina y se registró la duración total del período de recogida de orina. A continuación, se analizaron las muestras de orina para la creatinina mediante un analizador de inmunoquímica Olympus AU640. Se determinó la eliminación de creatinina (CrCl) mediante la siguiente ecuación; $CrCl = \text{creatinina en orina (mg/dl)} \times \text{volumen de orina (ml/hora)} / [\text{creatinina sérica (mg/dl)} \times \text{peso corporal (kg)}]$.

Se evaluaron las muestras de orina para SCr los días 1, 4, 6 y 8 y a continuación se calculó la CrCl (Tabla 24, Figura 8). Se administró cisplatino a todos los animales y mostraron niveles iniciales similares, con una disminución drástica en los valores medios de CrCl para todos los grupos del día 1 al día 4. Todos los grupos de tratamiento mostraron un marcado aumento en la CrCl, variando los niveles medios de 2,304-2,595 ml/min el día 1 a 0,381-0,459 ml/min el día 4. Los animales con vehículo de control mostraron un aumento en la CrCl el día 6 (1,290 ml/min), que aumentó adicionalmente el día 8, acercándose a los niveles iniciales (1,802 ml/min). Esto confirma la naturaleza transitoria de la lesión nefrotóxica a medida que la función renal comenzó a mejorar para el día 6 siendo los niveles de CrCl casi los iniciales para el día 8. Asimismo, las CrCl para los animales a los que se administró hUTC (Grupos 2-4) eran comparables o ligeramente inferiores a las de los animales con vehículo de control. El tratamiento con hUTC a un nivel de dosis de 3×10^6 células/animal (Grupo 4) mostró una mejora de la CrCl, en comparación con el vehículo de control, el día 6 (1,792 ml/min frente a 1,290 ml/min en el vehículo de control).

Tabla 24

		Análisis de CrCl			
Grupo de tratamiento		Día 1	Día 4	Día 6	Día 8
1 - vehículo	Media (mg/dl)	2,337	0,381	1,290	1,802
	EEM (mg/dl)	0,225	0,056	0,143	0,185
2 – 0,3 x 10 ⁶	Media	2,415	0,350	1,471	1,956
	EEM	0,164	0,030	0,168	0,214
3 – 1,0 x 10 ⁶	Media	2,595	0,459	1,340	1,632
	EEM	0,282	0,078	0,220	0,204
4 – 3,0 x 10 ⁶	Media	2,304	0,420	1,792	2,264
	EEM	0,177	0,080	0,152	0,202

Se describen los efectos renoprotectores de las hUTC en un modelo de rata de nefrotoxicidad inducida por cisplatino. La administración de 3.0e⁶ hUTC dio como resultado una reducción moderada en el BUN, SCr y un aumento en la CrCl en comparación con el tratamiento con vehículo de control. El cisplatino es uno de los agentes antitumorales más comunes utilizados en la quimioterapia de tumores malignos. Por lo tanto, la administración de hUTC protege al riñón de las lesiones nefrotóxicas, mejorando en última instancia los resultados y la calidad de vida de los pacientes con cáncer sometidos a quimioterapia. Además, el tratamiento con hUTC puede reducir la gravedad de la necrosis tubular aguda e incluso evitar la IRA asociada con otras intervenciones médicas, tales como la observada después de una cirugía cardiovascular, así como en algunos pacientes que reciben fármacos antimicrobianos, agentes de contraste yodados, anestésicos, inmunosupresores y analgésicos.

EJEMPLO 11

Evaluación de la eficacia renoprotectora de las células derivadas de tejido de cordón umbilical humano en un modelo de roedor de nefropatía obstructiva

El fin del presente ejemplo predictivo es evaluar los efectos renoprotectores de las células derivadas de tejido de cordón umbilical humano (hUTC) en un modelo de obstrucción ureteral unilateral (OUU) de lesión renal. El modelo OUU es un modelo eficaz para la fibrosis tubulointersticial y la nefropatía obstructiva de corto plazo. Para evaluar la eficacia renoprotectora, se evaluarán la biodistribución de las células, el nitrógeno ureico en sangre (BUN), creatinina sérica (SCr) y la lesión histológica en ratones lesionados doce días después del trasplante de las células.

Se anestesiaron ratones C57BL/6J hembra (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine) con isoflurano al 1,3%. Se rasurará el abdomen de cada animal y se limpiará con alcohol al 70%, seguido de betadine. Se hará una incisión abdominal en la línea media. Se abrirá la pared abdominal y se colocarán los intestinos sobre el pecho y se protegerán con gasa húmeda. Se localizará el riñón izquierdo y se diseccionará la grasa del uréter. Se colocarán en el uréter dos suturas no absorbibles 8-0. A continuación, se devolverán los intestinos al abdomen y se colocará en la cavidad peritoneal un centímetro cúbico de solución salina caliente. Se cerrará la capa muscular con Dexon 4-0 y se cerrará la piel con grapas. Se suspenderá el isoflurano y se dejará que los ratones se recuperen con oxígeno al 100% en una almohadilla térmica hasta que puedan deambular.

Inmediatamente después que los animales se recuperen de la cirugía, se descongelarán hUTC a 37°C, se lavarán dos veces en solución salina equilibrada de Hanks sin Ca⁺⁺/Mg⁺⁺ (HBSS) y se resuspenderán en un mililitro de HBSS. A continuación, se contarán las células mediante un hemocitómetro y se determinará la viabilidad celular mediante exclusión con colorante azul de tripano. Las células se reconstituirán a una concentración de 1,0 x 10⁶ células viables/mililitro en HBSS. A continuación, se trasplantarán las células suspendidas en 200 microlitros de HBSS, por inyección en la vena de la cola, utilizando una jeringa de un mililitro provista de una aguja de calibre 27.

Se sacrificará a todos los animales el día 12 después del trasplante de las células mediante asfixia con dióxido de carbono. Se extirparán a cada animal los riñones, los pulmones, el cerebro y el corazón. A continuación, se fijará la mitad de cada riñón en formalina tamponada neutra al 10% para el análisis histológico. El medio riñón restante, y los demás órganos se congelarán de forma instantánea en nitrógeno líquido. A continuación, se homogeneizaron todos los órganos congelados mediante un homogeneizador Omni TH equipado con una sonda de generador rotor estator desechable de 7 mm (Omni International, Inc., Marietta, GA). A continuación, se extraerá el ARN total utilizando un kit RNeasy Mini Plus (Qiagen, Valencia, CA). Se eluirá el ARN con 50 µl de agua tratada con DEPC y se cuantificará mediante un NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). Se someterá el ARN a transcripción inversa utilizando hexámeros aleatorios y reactivos de transcripción inversa Taqman (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las reacciones de PCR se realizarán en muestras de ADNc utilizando sondas cebador de β2 microglobulina específica de humanos (número de catálogo 4310886E, Applied Biosystems, Foster City, CA). La PCR se realizará mediante un sistema de detección de secuencia ABI Prism 7900 HT (Applied Biosystems, Foster City, CA).

En el momento de la necropsia, se recogerá sangre completa, se dejará coagular, se colocará en tubos de

microcentrífuga y se centrifugará a 2.500 rpm durante 15 minutos para separar el suero de los demás componentes sanguíneos. A continuación, se analizarán las muestras de suero mediante un analizador de química VetAce (Alpha Wassermann Diagnostic Technologies, LLC, West Caldwell, NJ).

5 Se embeberá tejido renal fijado en cera de parafina, se cortará (5 µm de espesor) y se teñirá con hematoxilina/eosina (H&E) y tricrómica de Masson. A continuación, se puntuarán los cortes para la lesión tubular (necrosis tubular, dilatación, infiltrado celular intersticial) y la fibrosis intersticial (deposición de colágeno) utilizando un índice de puntuación que varía de 1 a 4 (1 = mínima, 2 = leve, 3 = moderada, 4 = grave). El evaluador desconocerá las asignaciones de los grupos de tratamiento.

10 Se espera que la administración de células derivadas de tejido de cordón umbilical humano dé como resultado una reducción en el contenido global de la lesión tubular según se valora mediante evaluación histológica.

15 EJEMPLO 12

Evaluación de la eficacia renoprotectora del trasplante local de células derivadas de tejido de cordón umbilical humano en un modelo de remanente 5/6 de enfermedad renal crónica

20 El fin del presente ejemplo predictivo es determinar los efectos renoprotectores de la implantación local subcapsular de hUTC en un modelo de roedor de enfermedad renal crónica.

25 Para estos experimentos se utilizarán ratas SD (n = 30; 8 semanas de edad, macho) con un peso inicial de 200 g-250 g. Se anestesiará a las ratas con una inyección intraperitoneal (5 mg/kg) de una solución 4:1 de clorhidrato de ketamina y clorhidrato de xilazina. Se inducirá la insuficiencia renal mediante un procedimiento de nefrectomía de dos etapas. Se resecarán las partes superior e inferior del riñón izquierdo (dos tercios de un riñón) mediante ligadura de seda conservando al mismo tiempo la cápsula renal. Diez días después, se extirpará el riñón derecho, dejando aproximadamente 1/6 de la masa renal total (nefrectomía 5/6). La aplicación de presión suave con metilcelulosa detendrá el sangrado, y se cerrarán en capas el peritoneo y la piel con suturas Vicryl reabsorbibles 4-0.

30 Cinco semanas después del procedimiento de nefrectomía 5/6, se trasplantarán hUTC bajo la cápsula del tejido restante de las ratas con insuficiencia renal utilizando matriz de gel de fibrina. Se preparará solución de fibrinógeno (1,0 ml) que contenga hUTC (60 millones de células) y una solución de trombina (1,0 ml). Se anestesiará a las ratas y se expondrá el riñón remanente mediante laparotomía en la línea media. Mediante una jeringa diseñada para la inyección simultánea de las soluciones de fibrina y trombina, se inyectarán en el espacio subcapsular a través de una aguja hipodérmica de calibre 18, 0,1 ml de la mezcla 1:1 (relación en volumen) de solución de fibrinógeno y trombina que contiene las células. Como control, se inyectará a las ratas con nefrectomía 5/6 matriz de fibrina solamente.

35 Las muestras de suero se obtendrán el día 0 (antes de la nefrectomía 5/6) y el día 1 (día del trasplante de células), los días 7, 14, 21, 28 y 35 (día de la necropsia). Se cuantificarán el nitrógeno ureico en sangre y la creatinina mediante un analizador de química VetAce (Alpha Wassermann Diagnostic Technologies, LLC, West Caldwell, NJ).

40 Se sacrificará a los animales en todos los grupos cinco semanas después del trasplante de las células mediante asfixia con dióxido de carbono. Se extirparán los riñones para la histología y el análisis de la transcripción. La mitad de cada riñón se congelará de forma instantánea en nitrógeno líquido para el análisis de RT-PCR. El ARN mensajero será aislado a partir de tejido renal congelado por el coordinador del estudio y se someterá a análisis de la transcripción mediante tarjetas de micromatrices de baja densidad que contengan genes profibróticos e inflamatorios. El corte de riñón corneal restante se fijará en formalina tamponada neutra al 10% para el análisis histológico posterior.

45 Se procesará histológicamente el tejido renal fijado para la histología, se cortará (5 µm de espesor) y se teñirá con hematoxilina/eosina. Se evaluará la lesión tubular y será puntuada por un patólogo veterinario.

50 En el presente estudio, se espera que el trasplante subcapsular de 6.0e6 hUTC embebido en fibrina retrase la evolución de la lesión renal en los roedores con nefrectomía 5/6. Se espera que los valores de creatinina sérica y nitrógeno ureico en sangre se reduzcan significativamente en los animales tratados con hUTC en comparación con los animales de control. Además, la evaluación de la lesión histológica debería revelar una reducción de la necrosis tubular y dilatación tubular en los animales tratados. También se espera observar una reducción en el grado global de expresión génica inflamatoria en los riñones de los roedores tratados con hUTC en comparación con los riñones del grupo de control.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Células obtenidas de tejido de cordón umbilical humano para su uso en el tratamiento de un paciente con lesión o insuficiencia renal aguda o enfermedad renal crónica, en el que el tejido de cordón umbilical está sustancialmente libre de sangre, y en el que las células son capaces de autorrenovarse y desarrollarse en cultivo y tienen el potencial de diferenciarse; necesitan L-valina para crecer; son capaces de crecer en atmósferas que contienen oxígeno del 5% al 20%; no producen CD117 ni HLA-DR; expresan alfa-actina de músculo liso; y expresan, en comparación con una célula madre mesenquimal, célula de médula ósea de cresta iliaca o fibroblasto humano, mayores niveles de receptor 1 de lipoproteínas de baja densidad oxidadas, interleucina 8 o reticulón 1.
- 10 2. Células para su uso según la reivindicación 1, en el que las células expresan receptor 1 de lipoproteínas de baja densidad oxidadas, reticulón, ligando 3 del receptor de quimiocinas y/o proteína 2 quimiotáctica para granulocitos.
- 15 3. Células para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que las células expresan CD10, CD13, CD44, CD73 y CD90.
- 20 4. Células para su uso según cualquier reivindicación anterior, en el que el uso en el tratamiento de un paciente comprende administrar las células
- 25 a) mediante inyección o infusión,
b) encapsuladas dentro de un dispositivo implantable, o
c) mediante implantación de una matriz que comprende las células.
- 30 5. Células para su uso según cualquier reivindicación anterior, en el que el uso en el tratamiento de un paciente comprende administrar las células con al menos otro tipo de célula, o con al menos un agente, en el que el al menos otro tipo de célula o el al menos un agente se administra simultáneamente con, o antes, o después, de las células obtenidas de tejido de cordón umbilical humano.
- 35 6. Células para su uso según cualquier reivindicación anterior, en el que las células ejercen un efecto trófico sobre el riñón del paciente.
- 40 7. Células para su uso según cualquier reivindicación anterior, en el que el daño al riñón es inducido por la edad, un traumatismo, la exposición a toxinas, la exposición a fármacos, la exposición a radiación, la oxidación, la deposición de inmunocomplejos o el rechazo de trasplante.
- 45 8. Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un paciente con lesión o insuficiencia renal aguda o enfermedad renal crónica, que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y células obtenidas de tejido de cordón umbilical humano en el que el tejido de cordón umbilical está sustancialmente libre de sangre, y en el que las células son capaces de autorrenovarse y desarrollarse en cultivo y tienen el potencial de diferenciarse; necesitan L-valina para crecer; son capaces de crecer en atmósferas que contienen oxígeno del 5% al 20%; no producen CD117 ni HLA-DR; expresan alfa-actina de músculo liso; y expresan, en comparación con una célula madre mesenquimal, célula de médula ósea de cresta iliaca o fibroblasto humano, mayores niveles de receptor 1 de lipoproteínas de baja densidad oxidadas, interleucina 8 o reticulón 1.
- 50 9. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 8, en la que el daño al riñón es inducido por la edad, un traumatismo, la exposición a toxinas, la exposición a fármacos, la exposición a radiación, la oxidación, la deposición de inmunocomplejos o el rechazo de trasplante.
- 55 10. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 8 o la reivindicación 9, que comprende adicionalmente al menos otro tipo de célula o al menos un agente.
- 60 11. Composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 8-10, formulada para administrarse mediante inyección o infusión.
- 65 12. Composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 8-11, en la que las células están encapsuladas dentro de un dispositivo implantable o en la que las células se siembran en una matriz.
13. Kit para su uso en el tratamiento de un paciente con lesión o insuficiencia renal aguda o enfermedad renal crónica, que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable, células obtenidas de tejido de cordón umbilical humano en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad o lesión, en el que el tejido de cordón umbilical está sustancialmente libre de sangre, y en el que las células son capaces de autorrenovarse y desarrollarse en cultivo y tienen el potencial de diferenciarse; necesitan L-valina para crecer; son capaces de crecer en atmósferas que contienen oxígeno del 5% al 20%; no producen CD117 ni HLA-DR; expresan alfa-actina de músculo liso; y expresan, en comparación con una célula madre mesenquimal, célula de médula ósea de cresta iliaca o fibroblasto humano, mayores niveles de receptor 1 de lipoproteínas de baja densidad oxidadas, interleucina 8 o reticulón 1, y las instrucciones para utilizar el kit en un método para tratar a un paciente con lesión o insuficiencia renal aguda o

enfermedad renal crónica.

14. Kit para su uso según la reivindicación 13, que comprende adicionalmente

- 5 a) al menos un reactivo para e instrucciones para cultivar las células,
 b) una población de al menos otro tipo de célula, o
 c) al menos un agente.

10 15. Fracción celular soluble, lisado, matriz extracelular o medio acondicionado preparado a partir de células
 obtenidas de tejido de cordón umbilical humano para su uso en el tratamiento de un paciente con lesión o
 insuficiencia renal aguda o enfermedad renal crónica, en el que el tejido de cordón umbilical está sustancialmente
 libre de sangre, y en el que las células son capaces de autorrenovarse y desarrollarse en cultivo y tienen el potencial
 de diferenciarse; necesitan L-valina para crecer; son capaces de crecer en atmósferas que contienen oxígeno del
15 5% al 20%; no producen CD117 ni HLA-DR; expresan alfa-actina de músculo liso; y expresan, en comparación con
 una célula madre mesenquimal, célula de médula ósea de cresta ilíaca o fibroblasto humano, mayores niveles de
 receptor 1 de lipoproteínas de baja densidad oxidadas, interleucina 8 o reticulón 1.

20 16. Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un paciente con lesión o insuficiencia renal aguda o
 enfermedad renal crónica, que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un lisado, matriz extracelular
 o medio acondicionado preparado a partir de células obtenidas de tejido de cordón umbilical humano, en el que el
 tejido de cordón umbilical está sustancialmente libre de sangre, y en el que las células son capaces de
 autorrenovarse y desarrollarse en cultivo y que tienen el potencial de diferenciarse; necesitan L-valina para crecer;
 son capaces de crecer en atmósferas que contienen oxígeno del 5% al 20%; no producen CD117 ni HLA-DR;
25 expresan alfa-actina de músculo liso; y expresan, en comparación con una célula madre mesenquimal, célula de
 médula ósea de cresta ilíaca o fibroblasto humano, mayores niveles de receptor 1 de lipoproteínas de baja densidad
 oxidadas, interleucina 8 o reticulón 1.

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

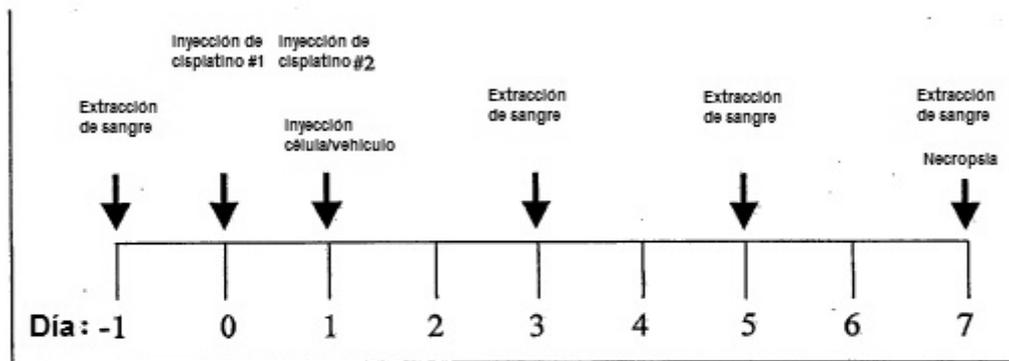


Figura 2

Supervivencia

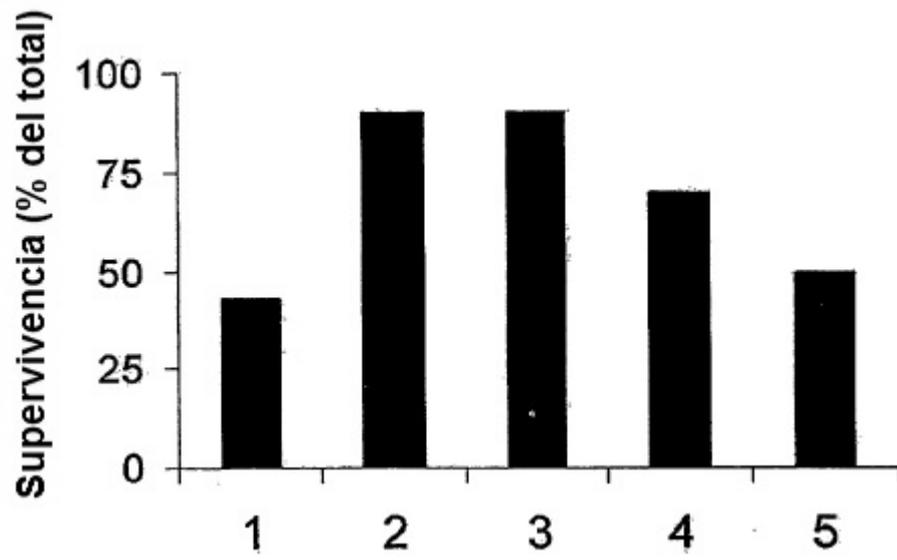


Figura 3

Análisis BUN

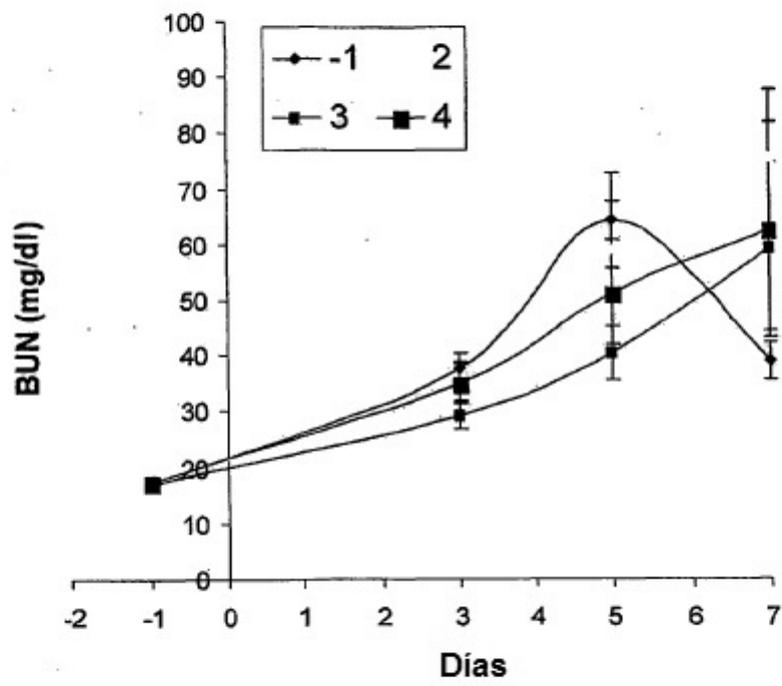


Figura 4

Creatinina sérica

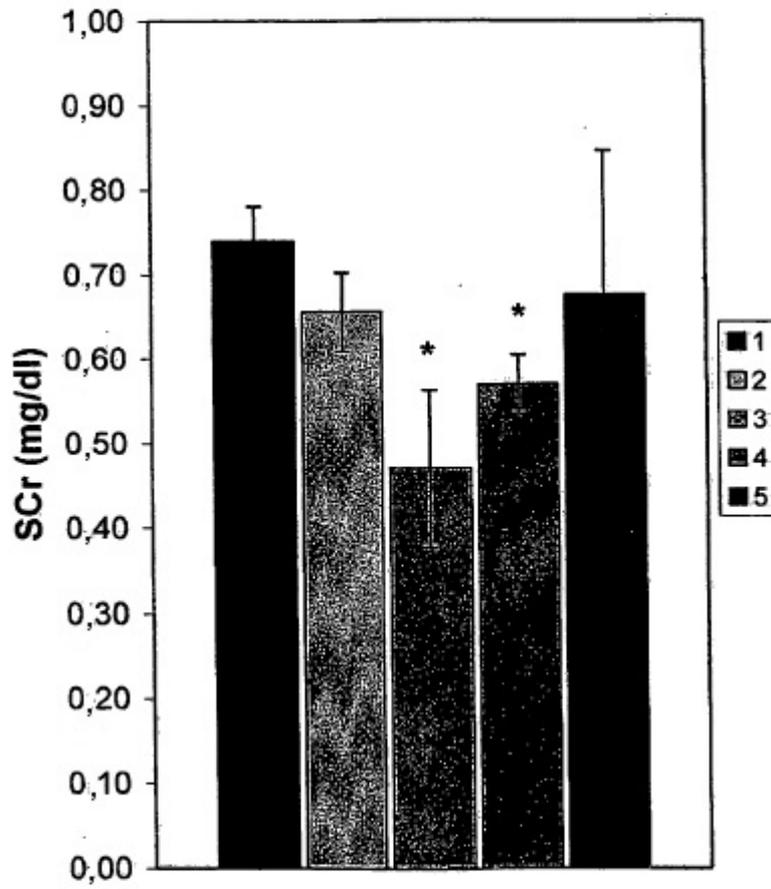


Figura 5

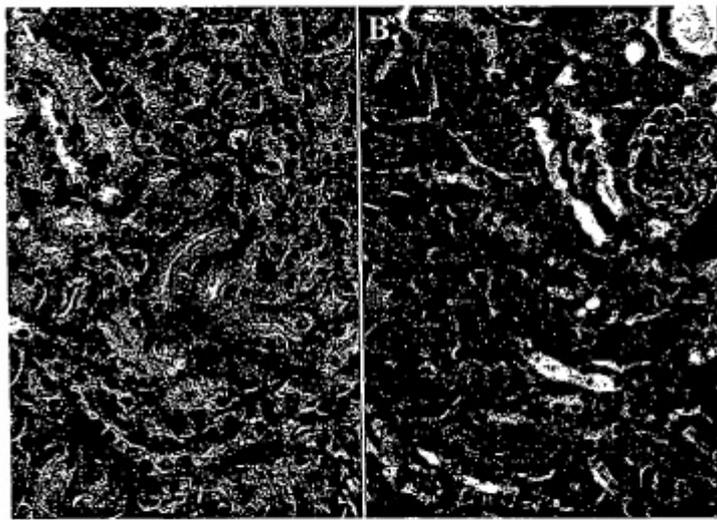


Figura 6

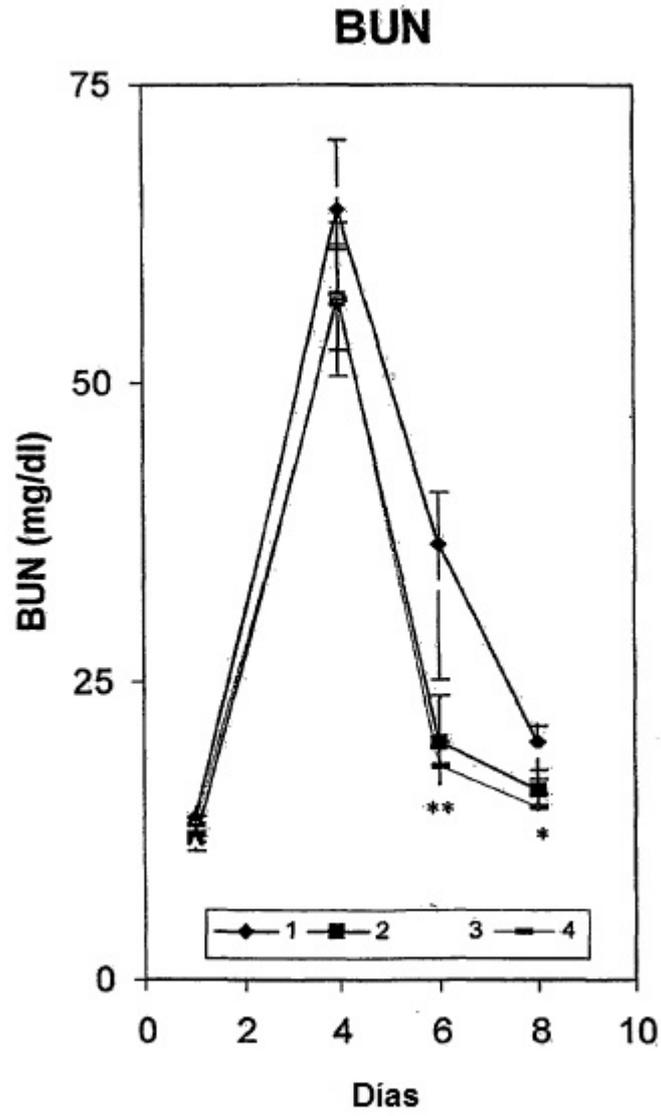


Figura 7

Creatinina sérica

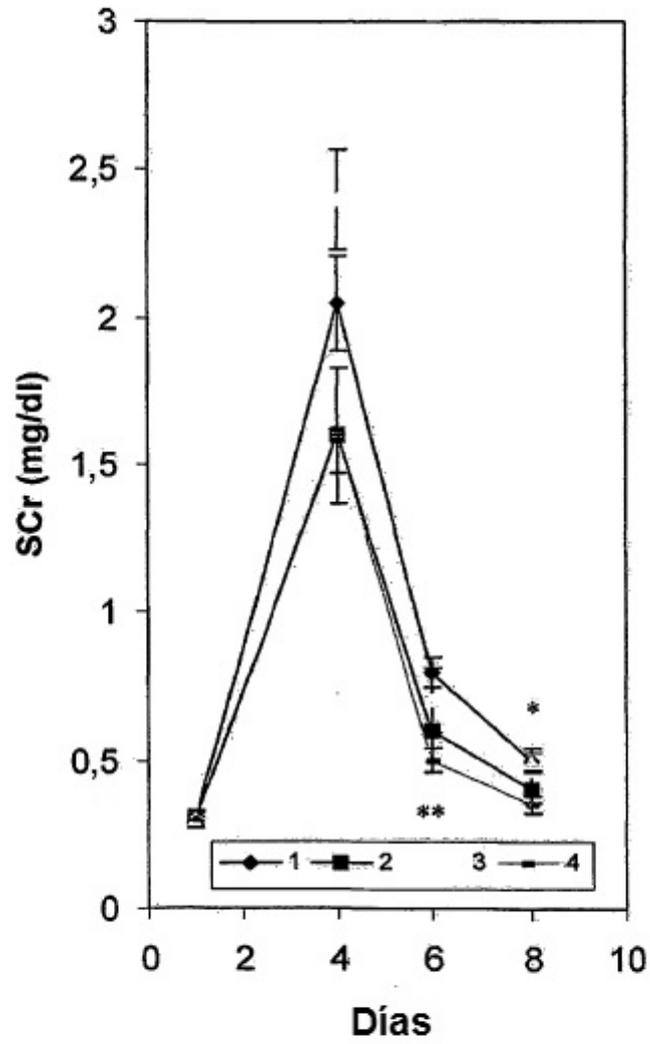


Figura 8

Eliminación de creatinina

