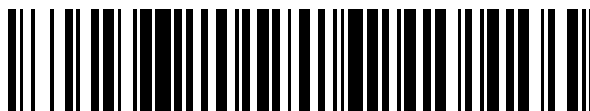


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 293**

51 Int. Cl.:

C12N 5/073

(2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2005** **E 05743325 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014** **EP 1789534**

54 Título: **Aislamiento de células madre/progenitoras de membrana amniótica del cordón umbilical**

30 Prioridad:

16.08.2004 US 602208 P
01.12.2004 US 632209 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.01.2015

73 Titular/es:

CELLRESEARCH CORPORATION PTE LTD
(100.0%)
03-09 CLINICAL RESEARCH CENTRE BLOCK
MD-11, 10 MEDICAL DRIVE
SINGAPORE 117597, SG

72 Inventor/es:

PHAN, TOAN-THANG y
LIM, IVOR JIUN

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 527 293 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Aislamiento de células madre/progenitoras de membrana amniótica del cordón umbilical

La presente invención se refiere a un procedimiento de aislamiento de células madre/progenitoras epiteliales o mesenquimatosas de la membrana amniótica del cordón umbilical, en el que el procedimiento comprende separar la membrana amniótica de los otros componentes del cordón umbilical *in vitro*, cultivar el tejido de la membrana amniótica en condiciones que permiten la proliferación celular y aislar las células madre/progenitoras de los cultivos tisulares. La invención también se refiere al aislamiento y cultivo de tales células madre que tienen propiedades embrionarias en condiciones que permiten que las células experimenten expansión mitótica. Además, la invención se refiere a un procedimiento para la diferenciación de tales células madre/progenitoras aisladas y a los usos terapéuticos de estas células madre/progenitoras.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las células madre son una población de células que poseen las capacidades de auto-renovarse indefinidamente y de diferenciarse en múltiples células o tipos de tejido. Las células madre embrionarias (de aproximadamente los días 3 a 5 después de la fecundación) proliferan indefinidamente y pueden diferenciarse espontáneamente en todos los tipos de tejidos: así, estas se denominan células madre pluripotentes (revisado, por ejemplo, en Smith, A.G. (2001) *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **17**, 435-462). Sin embargo, las células madre adultas son más específicas del tejido y pueden tener menos capacidad replicativa: así estas se denominan células madre multipotentes (revisado, por ejemplo, en Paul, G. y col. (2001) *Drug Discov. Today* **7**, 295-302). La "plasticidad" de las células madre embrionarias y adultas se basa en su capacidad para trans-diferenciarse en tejidos diferentes de su origen y quizás, a través de las capas germinales embrionarias.

La capacidad de las células madre para auto-renovarse es crítica para su función como depósito de células no diferenciadas primitivas. Por el contrario, la mayoría de las células somáticas tiene una capacidad limitada para la auto-renovación debido al acortamiento del telómero (revisado, por ejemplo, en Dice, J.F. (1993) *Physiol. Rev.* **73**, 149-159). Así, las terapias basadas en células madre tienen la posibilidad de ser útiles para el tratamiento de una pluralidad de enfermedades humanas y animales.

Las células madre, además de las células madre/progenitoras, pueden derivarse de diferentes fuentes. Se ha caracterizado ampliamente el potencial de "linajes múltiples" de las células embrionarias madre y adultas. Aún cuando el potencial de las células madre es enorme, su uso implica muchos problemas éticos. Por lo tanto, se han propuesto las células madre no embrionarias derivadas del estroma de la médula ósea, el tejido adiposo, la dermis y sangre del cordón umbilical como fuentes alternativas. Estas células pueden diferenciarse, entre otras, en condrocitos, adipocitos, osteoblastos, mioblastos, cardiomiocitos, astrocitos y tenocitos *in vitro* y experimentar diferenciación *in vivo*, haciendo a estas células madre – en general denominadas células madre mesenquimatosas – prometedores candidatos para la reparación de defectos mesodérmicos y el tratamiento de enfermedades.

Sin embargo, en el uso clínico, la recogida de tales células madre mesenquimatosas provoca varios problemas. La recogida de las células es una carga mental y física para el paciente ya que se requiere un procedimiento quirúrgico para obtener las células (por ejemplo, la recogida de médula ósea es una táctica invasiva realizada con una aguja de biopsia que requiere anestesia local o incluso general). Además, en muchos casos, el número de células madre extraídas es más bien bajo. De manera más importante, las células no epiteliales se derivan o diferencian de estas células. Esto promovió la búsqueda para otras posibles fuentes de células madre.

La sangre del cordón umbilical se ha identificado como una fuente rica de células madre/progenitoras hematopoyéticas. Sin embargo, la existencia de células madre/progenitoras mesenquimatosas se ha tratado de manera controvertida. Por una parte, tales células no pudieron aislarse o se cultivaron exitosamente a partir de sangre del cordón umbilical a término (Mareschi, K y col., (2001) *Haematologica* **86**, 1099-1100). Al mismo tiempo, los resultados obtenidos por Campagnoli, C. y col. (*Blood* (2001) **98**, 2396-2402), además de por Erices, A. y col. (*Br. J. Haematol.* (2000) **109**, 235-242) sugieren que las células madre mesenquimatosas están presentes en varios órganos fetales y circulan en la sangre de los fetos a pre-término, simultáneamente con los precursores hematopoyéticos. En consecuencia, la solicitud de patente internacional WO 03/070922 desvela procedimientos de aislamiento y de expansión en cultivo de células madre/progenitoras mesenquimatosas de sangre del cordón umbilical y un procedimiento de diferenciación de tales células en varios tejidos mesenquimatosos. Se ha informado de eficiencias de aislamiento de aproximadamente el 60 % (Bieback, K. y col. (2004) *Stem Cells* **22**, 625-634). En el mismo estudio, se ha determinado que tanto el periodo de tiempo desde la recogida de la sangre del cordón umbilical hasta el aislamiento de las células y el volumen de la muestra de sangre usada son parámetros cruciales para lograr tal rendimiento. Sin embargo, todavía es un asunto de debate si estas células madre/progenitoras se derivan en verdad de tejido del cordón umbilical.

Recientemente, se ha aislado exitosamente células madre/progenitoras mesenquimatosas de tejido del cordón umbilical, concretamente de gelatina de Wharton, la matriz del cordón umbilical (Mitchel, K.E. y col. (2003) *Stem Cells* **21**, 50-60;

patente de Estados Unidos n.º: 5.919.702; solicitud de patente de Estados Unidos n.º: 2004/0136967). Se ha mostrado que estas células tienen la capacidad de diferenciarse, por ejemplo, en un fenotipo neuronal y en tejido cartilaginoso, respectivamente. Además, también se han aislado células madre/progenitoras mesenquimatosas del endotelio y la capa subendotelial de la vena del cordón umbilical, uno de los tres vasos (dos arterias, una vena) encontrados dentro del cordón umbilical (Romanov, Y.A. y col. (2003) *Stem Cells* **21**, 105-110; Covas, D.T. y col. (2003) *Braz. J. Med. Biol. Res.* **36**, 1179-1183). Finalmente, en la solicitud de patente europea EP 1 288 293, se han aislado células madre/progenitoras mesenquimatosas de la membrana amniótica de la placenta.

Sin embargo, ninguno de estos enfoques empleados hasta ahora ha producido el aislamiento o cultivo de células madre/progenitoras endoteliales como una fuente para terapias basadas en células epiteliales, tales como acondicionamiento superficial de la piel, reparación del hígado, manipulación por ingeniería tisular de la vejiga y otros tejidos superficiales manipulados por ingeniería. Así, existe todavía una necesidad de procedimientos y fuentes fidedignas, útiles para el aislamiento y cultivo de células madre/progenitoras epiteliales. Además, todavía se requieren procedimientos rápidos y eficientes que son éticamente aceptables y no imponen una carga biomédica sobre el paciente para el aislamiento de células madre/progenitoras epiteliales y mesenquimatosas con el fin de proporcionar tales células en una cantidad suficiente para diversas aplicaciones en medicina regenerativa y en ingeniería tisular.

RESUMEN DE LA INVENCION

La invención proporciona un procedimiento de aislamiento de células madre/progenitoras epiteliales o mesenquimatosas de la membrana amniótica del cordón umbilical, expresando las células madre/progenitoras epiteliales o mesenquimatosas el gen POU5f1 que codifica el factor de transcripción octámero-4 (Oct-4), comprendiendo el procedimiento:

(a) separar la membrana amniótica de los otros componentes del cordón umbilical aislado *in vitro*;

(b) cultivar el tejido de la membrana amniótica obtenido en la etapa (a) en un medio de cultivo en condiciones que permitan la proliferación celular; y

(c) aislar las células madre/progenitoras epiteliales o mesenquimatosas.

En una realización, la invención proporciona un procedimiento, que comprende además:

(a") separar las células del tejido de la membrana amniótica antes del cultivo por una digestión enzimática o explante tisular directo.

En una realización preferida, la invención proporciona un procedimiento de aislamiento de células madre/progenitoras epiteliales o mesenquimatosas que tienen propiedades similares a células madre embrionarias.

En otra realización, la invención proporciona un procedimiento que comprende además:

(d) cultivar las células madre/progenitoras en un medio de cultivo en condiciones que permitan que las células experimenten expansión clónica.

En otra realización más, la invención proporciona un procedimiento que comprende además:

(e) cultivar las células madre/progenitoras epiteliales o mesenquimatosas en condiciones que permitan la diferenciación de dichas células en células epiteliales y/o células mesenquimatosas; y

(f) aislar las células diferenciadas.

En otra realización más, la invención proporciona un procedimiento, que comprende además:

(g) preservar las células madre/progenitoras epiteliales o mesenquimatosas aisladas para uso adicional.

En todavía otra realización, la invención que comprende un procedimiento *in vitro* de cultivo de células madre/progenitoras de la invención, que comprende:

Obtener un explante tisular de la membrana amniótica aislada del cordón umbilical;

Cultivar el explante tisular en medios de cultivo y condiciones de cultivo adecuadas durante un periodo de tiempo adecuado.

En todavía otras realizaciones, la invención se refiere a usos terapéuticos de las células madre/progenitoras epiteliales o mesenquimatosas. Una de estas realizaciones proporciona la célula madre epitelial o mesenquimatosa de la invención para tratar un sujeto que tiene un trastorno seleccionado del grupo que consiste en trastorno tisular, enfermedad

neoplásica, enfermedad de la piel, deficiencia endocrina visceral y un trastorno neural. Otra realización proporciona una composición farmacéutica que comprende un citoblasto epitelial o mesenquimatoso de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La invención se entenderá mejor con referencia a la descripción detallada cuando se considere en conjunto con los ejemplos no limitantes y los dibujos, en los que:

La **Figura 1** representa el crecimiento de las células epiteliales de la membrana amniótica del cordón umbilical por el procedimiento de explante tisular directo (40X aumentos) en el día 2 (**Fig. 1A**) y día 5 (**Fig. 1B, C**) de cultivo de tejidos. Se recubrieron las superficies de plástico del cultivo celular con mezclas de colágeno 1/colágeno 4 (1:2; Becton Dickinson) antes de colocar la membrana amniótica sobre la superficie. Se sumergieron los especímenes de membrana amniótica en 5 ml de medio EpiLife o medio 171 (ambos de Cascade Biologics). El medio se cambió cada 2 o 3 días y el crecimiento celular por explante se monitorizó por microscopía óptica. Se tomaron microfotografías a diferentes intervalos de tiempo como se estableció anteriormente. La morfología celular poliédrica observada es típica de las células epiteliales.

La **Figura 2** representa la digestión enzimática de los segmentos de cordón umbilical que producen células epiteliales similares (40X aumentos) en el día 2 (**Fig. A, C**) y día 5 (**Fig. B, D**). Se dividió la membrana amniótica del cordón umbilical en trozos pequeños de 0,5 cm x 0,5 cm y se digirió en disolución de collagenasa tipo 1 al 0,1% (p/v) (Roche Diagnostics) a 37 °C durante 8 horas. Las muestras se agitaron con vórtex cada 30 minutos durante 3 minutos. Las células se recogieron por centrifugación a 4000 rpm durante 30 minutos. Los sedimentos celulares se resuspendieron en medio EpiLife o medio 171 (ambos de Cascade Biologics) complementado con 50 µg/ml de factor de crecimiento 1 similar a insulina (IGF-1), 50 µg/ml de factor BB de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB), 5 µg/ml de factor de crecimiento transformante β1 (TGF-β1) y 5 µg/ml de insulina (todos obtenidos de R&D Systems), se contaron y se sembraron sobre placas de cultivo de tejido de 10 cm previamente recubiertas con mezclas de colágeno 1/colágeno 4 (1:2; Becton Dickinson) a una densidad de 1×10^6 células/placa. Después de 24 horas, las células adheridas se lavaron con solución salina tamponada con fosfato caliente (PBS) y el medio de cultivo se sustituyó con medio EpiLife o medio 171 (ambos de Cascade Biologics). El medio se cambió cada 2 o 3 días y el crecimiento celular se monitorizó por microscopía óptica. Se tomaron microfotografías a diferentes intervalos de tiempo como se establece anteriormente. Una vez más, las células demostraron morfología poliédrica de células epiteliales típicas.

La **Figura 3** representa el crecimiento de células mesenquimatosas explantadas de membrana amniótica del cordón umbilical. El crecimiento celular se observó tan pronto como 48 horas después de la colocación en placas de cultivo de tejido usando DMEM complementado con 10 % de suero de ternera fetal (STF) como medio de cultivo (40X aumentos) (**Fig. 3A, C**). Los explantes se sumergieron en 5 ml de DMEM (Invitrogen) complementado con 10 % de suero bovino fetal (Hyclone) (DMEM/10 % de SBF). El medio se cambió cada 2 o 3 días. El crecimiento celular se monitorizó por microscopía óptica. Se tomaron microfotografías a diferentes intervalos de tiempo. Las células se caracterizaron por su morfología fusiforme y migraron y se expandieron tanto fácil como rápidamente *in vitro*, asemejándose estrechamente a fibroblastos (**Fig. 3B, D**).

La **Figura 4** (40X aumentos) representa células mesenquimatosas de células de la membrana amniótica del cordón umbilical aisladas mediante digestión enzimática con collagenasa. La **Fig. 4A** muestra células mesenquimatosas aisladas de la membrana amniótica del cordón umbilical en el día 2. Se observó proliferación celular en el día 5 (**Fig. 4B**). La membrana amniótica del cordón umbilical se dividió en trozos pequeños de 0,5 cm x 0,5 cm y se digirió en disolución de collagenasa tipo 1 al 0,1 % (p/v) (Roche Diagnostics) a 37 °C durante 6 horas. Las muestras se agitaron con vórtex cada 15 minutos durante 2 minutos. Las células se recogieron por centrifugación a 4000 rpm durante 30 minutos. Los sedimentos celulares se resuspendieron en DMEM/10 % de SBF, se contaron y se sembraron sobre placas de cultivo de tejido de 10 cm a una densidad de 1×10^6 células/placa. El medio se cambió cada 2 o 3 días. El crecimiento celular se monitorizó por microscopía óptica. Se tomaron microfotografías a diferentes intervalos de tiempo. Una vez más, las células demostraron morfología fusiforme, típica de las células mesenquimatosas como fibroblastos.

La **Figura 5** (40X aumentos) representa la morfología en la condición de cultivo libre de suero (DMEM) y la condición de cultivo en suero (DMEM/10 % de STF) de células mesenquimatosas de membrana amniótica del cordón umbilical (UCMC, Fig. 5E, F, G, H) aisladas según el procedimiento de la invención, los fibroblastos dérmicos normales (células NF109, Fig. 5A, B) y células mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo (ADMC, Fig. 5C, D). La Fig. 5 muestra cambios en la morfología celular de NF y ADCM cultivadas en condiciones de privación de suero (DMEM solo) reflejada por células más planas y citoplasma menos denso en comparación con las condiciones ricas en suero (DMEM/10 % de STF) en las que las células son más redondas con un citoplasma denso (Fig. 5A, B, C, D). No se observó ningún cambio en la morfología en ambos grupos de UCMC cultivadas en condiciones idénticas de medio libre de suero frente a rico en suero (Fig. 5E, F, G, H), indicando una diferencia en el comportamiento y la fisiología de estas últimas células mesenquimatosas.

La **Figura 6** (40X aumentos) representa UCMC aisladas según la invención cultivadas en DMEM/10 % de STF en los días

3 y 7 sin una capa alimentadora de 3T3. Se observa que las células están creciendo bien y están formando una colonia (crecimiento vertical) en vez de mostrar dispersión radial. Una vez más, esto indica una diferencia en el comportamiento de estas células mesenquimatosas en comparación a sus homólogos más diferenciados.

La **Figura 7** (40X aumentos) representa la formación de colonias de células epiteliales del cordón umbilical (USEC) cultivadas sobre una capa alimentadora de 3T3 en los días 3 y 7. Esta apariencia es similar a la de células madre de queratinocitos epiteliales derivadas de piel normal. En las últimas, la capa alimentadora de 3T3 mantiene el linaje de las células.

La **Figura 8** (40X aumentos) representa la obvia formación de colonias de células mesenquimatosas de cordón umbilical (UCMC) aisladas según la invención cultivadas sobre una capa alimentadora de 3T3 en los días 3 y 7. La capa alimentadora de 3T3 normalmente suprime el crecimiento de células mesenquimatosas diferenciadas como fibroblastos dérmicos humanos. Una vez más, esto indica una diferencia en el comportamiento de estas células mesenquimatosas en comparación con sus homólogos más diferenciados.

La **Figura 9-1** a la **Figura 9-27** muestran análisis de transferencia Western mediante los que se comparó la expresión de varios marcadores de células madre embrionarias en UCEC y UCMC aisladas según la invención con la expresión de estos marcadores en fibroblastos dérmicos humanos (NF), en células mesenquimatosas de médula ósea (BMSC) y células mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo (ADMC). La **Fig. 9** muestra también la activina A altamente secretada y la folistatina detectada por el ensayo de ELISA en sobrenadantes de cultivo de células madre mesenquimatosas y epiteliales del cordón umbilical en comparación con células madre derivadas de médula ósea, de tejido adiposo, fibroblastos dérmicos humanos y queratinocitos epidérmicos.

La **Figura 10** muestra el análisis inmunofluorescente indirecto de los marcadores de células epiteliales expresadas en células madre epiteliales del cordón umbilical tales como las citoqueratinas (CK)-general, CK17, CK6, CK10, CK19, CK18, CK16, CK15 (**Fig. 10-1**); componentes de hemidesmosoma-integrina alfa 6, integrina beta 4; componentes de desmosoma (**Fig. 10-2**); componentes de la membrana basal – laminina 1, laminina 5, colágeno IV, colágeno VII (**Fig. 10-3**) y otros componentes importantes de la matriz extracelular como integrina-beta 1 y fibronectina (**Figura 10-4**).

La **Figura 11** muestra el análisis de matrices de citocinas de las citocinas secretadas y factores de crecimiento por las células madre mesenquimatosas del cordón umbilical (UCMC) en comparación con células madre mesenquimatosas de médula ósea humana.

La **Figura 12** muestra el análisis de matrices de citocinas de las citocinas secretadas y factores de crecimiento por las células madre epiteliales del cordón umbilical (UCEC) en comparación con queratinocitos epidérmicos humanos.

La **Figura 13** muestra células UCMC cultivadas en DMEM complementado con 10 % de suero de ternera fetal (STF) (**Fig. 13-1**), medio libre de suero PTT-1 (**Fig. 13-2**), en medio libre de suero PTT-2 (**Fig. 13-3**, **Fig. 13-4**) y en medio libre de suero PTT-3 (**Fig. 13-5**). La **Fig. 13** también muestra el crecimiento de células del estroma derivadas de tejido adiposo (**Fig. 13-6**) y células del estroma derivadas de médula ósea (**Fig. 13-7**) en medio libre de suero PTT-3.

La **Figura 14** muestra la expresión génica global en células madre epiteliales y mesenquimatosas del cordón umbilical analizadas mediante matrices de ADN. Las UCEC expresaron un total de 28055 genes y las UCMC expresaron un total de 34407 genes. Hay 27308 genes que se solapan que se expresan en ambos tipos de células. 747 genes expresados fueron únicos para UCEC y 7099 genes expresados fueron únicos para UCMC. Los genes seleccionados de interés se presentan en esta figura. Ambos tipos de células madre expresaron 140 genes relacionados con células madre embrionarias y el desarrollo embrionario.

La **Figura 15** muestra una ilustración esquemática de la expansión de células madre epiteliales y mesenquimatosas del cordón umbilical usando explantes repetitivos tisulares de la membrana del revestimiento del cordón umbilical.

La **Figura 16** describe una sección transversal de un cordón umbilical que demuestra la membrana de revestimiento amniótica del cordón umbilical (LM), la gelatina de Wharton contenida (WJ), así como dos arterias umbilicales (UA) y una vena umbilical (UV) soportada dentro de esta gelatina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La invención se basa en el sorprendente hallazgo de que la membrana amniótica del cordón umbilical representa una fuente, de la que pueden aislarse y expandirse exitosamente células madre/progenitoras mesenquimatosas y epiteliales en condiciones *in vitro*. Aún más sorprendente es el hallazgo de que estas células muestran características similares a las células madre embrionarias. La membrana amniótica (también llamada membrana de revestimiento amniótico), es decir, el saco membranoso más interno delgado que encierra la placenta y el embrión en desarrollo de los mamíferos, se ha usado recientemente como un sustrato natural en reconstrucción de la superficie ocular y como un sustrato biológico para la expansión de células madre epiteliales limbares (véanse, por ejemplo, Anderson, D.F. y col. (2001) *Br. J. Ophthalmol.* **85**, 567-575; Grüterich, M. y col. (2003) *Surv. Ophthalmol.* **48**, 631-646). Sin embargo, no se han descrito procedimientos

hasta ahora para el aislamiento de células madre/progenitoras de la membrana amniótica, al menos para seres humanos, ni tampoco se ha informado de la membrana amniótica que cubre el cordón umbilical como fuente para células madre.

La invención proporciona un procedimiento de aislamiento de células madre/progenitoras de la membrana amniótica aislada del cordón umbilical, según se define en la reivindicación 1.

5 El término "célula madre/progenitora", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier célula derivada de cordón umbilical que tenga las capacidades para auto-renovarse indefinidamente y para diferenciarse en múltiples tipos de células o de tejidos tales como células endoteliales, células epiteliales, fibroblastos, miocitos o neuronas. Además, las células pueden derivarse de cualquier especie de mamífero, tal como ratón, rata, cobaya, conejo, cabra, perro, gato, oveja, mono o ser humano, prefiriéndose células de origen humano en una realización.

10 El término "propiedades similares a las células madre embrionarias" se refiere a la capacidad de las células derivadas del cordón umbilical de poder diferenciarse - casi o exactamente como las células madre embrionarias - espontáneamente en todos los tipos de tejido, que significa que son células madre pluripotentes.

15 El término "membrana amniótica", como se usa en el presente documento, se refiere al saco membranoso más interno delgado que encierra el embrión en desarrollo de los mamíferos. Durante el embarazo, el feto está rodeado y amortiguado por un líquido llamado el líquido amniótico. Este líquido, junto con el feto y la placenta, está encerrado dentro de un saco llamado la membrana amniótica, que también cubre el cordón umbilical. El líquido amniótico es importante por varias razones. Amortigua y protege el feto, permitiendo que el feto se mueva libremente. El líquido amniótico también permite que el cordón umbilical flote, previniendo que sea comprimido y se corte el suministro de oxígeno y nutrientes al feto derivados de la sangre en circulación dentro de los vasos sanguíneos de la placenta. El saco amniótico contiene el líquido
20 amniótico que mantiene un ambiente homeostático que protege el ambiente fetal del mundo externo. Esta barrera protege adicionalmente al feto de los organismos (como bacterias o virus) que podrían atravesar la vagina y posiblemente causar infección.

Los medios y reactivos para el cultivo de tejidos se conocen bien en la técnica (véanse, por ejemplo, Pollard, J.W. y Walter, J.M. (1997) *Basic Cell Culture Protocols, Segunda Edición*, Humana Press, Totowa, NJ; Freshney, R.I. (2000)
25 *Culture of Animal Cells, Cuarta Edición*, Wiley-Liss, Hoboken, NJ). Ejemplos de medios adecuados para incubar/transportar muestras tisulares del cordón umbilical incluyen, pero no se limitan a, medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), medio RPMI, solución salina equilibrada de Hank (HBSS), solución salina tamponada con fosfato (PBS) y medio L-15, siendo último preferido en algunas realizaciones. Ejemplos de medios apropiados para cultivar las células madre/progenitoras según la invención incluyen, pero no se limitan a, medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), DMEM-F12, medio RPMI, medio EpiLife y medio 171, siendo el último preferido en algunas realizaciones. Los
30 medios pueden complementarse con suero de ternera fetal (STF) o suero bovino fetal (SBF), además de antibióticos, factores de crecimiento, aminoácidos, inhibidores o similares, lo que está perfectamente dentro del conocimiento general del experto en la técnica.

En una realización, la invención proporciona un procedimiento, que comprende además:

35 (a") separar estas células madre/progenitoras epiteliales o mesenquimatosas del tejido de la membrana amniótica por una digestión enzimática y/o técnica de explante tisular directo antes del cultivo. El término "técnica de digestión enzimática", como se usa en el presente documento, significa que las enzimas se añaden para escindir las células de la masa tisular principal (aquí la membrana amniótica del cordón umbilical). Las células separadas se recogen posteriormente. El término "técnica de explante tisular directo" como se usa en el presente documento significa que el tejido se dispone
40 inicialmente en medio sin enzimas. A continuación, en condiciones cuidadosas, las células se separan de la masa tisular principal por sí mismas y las células se recogen a continuación para la recolección.

Los procedimientos de separación de células de un tejido u órgano particular mediante tratamiento con enzimas o mediante explante tisular directo se conocen bien en la técnica (véanse, por ejemplo, Pollard, J.W. y Walter, J.M. (1997) *Basic Cell Culture Protocols, Segunda Edición*, Humana Press, Totowa, NJ; Freshney, R.I. (2000) *Culture of Animal Cells, Cuarta Edición*, Wiley-Liss, Hoboken, NJ). Puede usarse cualquier enzima que catalice la disociación tisular para realizar los procedimientos de la presente invención. En realizaciones preferidas, se usa collagenasa para ese fin. La enzima puede usarse como una preparación en bruto o en forma purificada. Puede purificarse a partir de cualquier organismo procarota o eucarota (siendo *Clostridium histolyticum* el más preferido) o producirse recombinantemente por medio de tecnología de genes. Puede emplearse cualquier tipo de collagenasa, es decir, tipo 1, tipo 2, tipo 3, tipo 4 o cualquier
50 combinación de los mismos. En algunas realizaciones, se está prefiriendo el uso de collagenasa tipo 1.

En una realización, la invención proporciona un procedimiento de aislamiento de células madre/progenitoras epiteliales o mesenquimatosas que tienen propiedades similares a las células madre embrionarias. Estas células pueden diferenciarse finalmente, pero no se limitan a, por morfología, en células epiteliales o mesenquimatosas.

Las células madre/progenitoras epiteliales incluyen cualquier célula que presente una morfología similar a las células

epiteliales (es decir una forma poliédrica) que pueda diferenciarse en cualquier tipo de célula epitelial tal como, pero no se limita a, células epiteliales de la piel, células foliculares del pelo, células epiteliales de la córnea, células epiteliales de la conjuntiva, células epiteliales de la retina, células epiteliales del hígado, células epiteliales del riñón, células epiteliales pancreáticas, células epiteliales esofágicas, células epiteliales del intestino delgado, células epiteliales del intestino grueso, células epiteliales del pulmón y de las vías respiratorias, células epiteliales de la vejiga o células epiteliales uterinas.

Las células madre/progenitoras mesenquimatosas incluyen cualquier célula que presente morfología similar a las células mesenquimatosas (es decir, una forma fusiforme) que pueda diferenciarse en cualquier tipo de célula mesenquimatosa tal como, pero no se limita a, fibroblastos de la piel, condrocitos, osteoblastos, tenocitos, fibroblastos de ligamentos, cardiomiocitos, células del músculo liso, células del músculo esquelético, adipocitos, células derivadas de las glándulas endocrinas y todas las variedades y derivados de células neuroectodérmicas.

En otra realización, la invención proporciona un procedimiento que comprende además:

(d) cultivar las células madre/progenitoras epiteliales o mesenquimatosas en condiciones que permiten que las células experimenten expansión clónica.

El término “expansión clónica” (algunas veces denominado “expansión clónica mitótica”) se refiere a un proceso que se produce tempranamente en el programa de diferenciación de una célula, mediante el que las células madre/progenitoras se llegan a comprometer a un linaje particular y a continuación experimentan diferenciación terminal. Se conocen bien en la técnica que las condiciones para inducir la expansión clónica de las células progenitoras pueden variar significativamente entre diferentes tipos celulares. Sin estar limitados a un procedimiento particular, la inducción de la expansión clónica se consigue generalmente cultivando las células madre/progenitoras en un medio que ha sido optimizado para la proliferación celular. Tales medios están comercialmente disponibles de muchos proveedores. Ejemplos no limitantes de tales medios son el medio KGM®-Keratinocyte (Cambrex), el medio de células epiteliales mamarias MEGM (Cambrex), el medio EpiLife (Cascade Biologics) o el medio 171 (Cascade Biologics). Alternativamente, un medio de cultivo puede complementarse con reactivos que inducen la proliferación celular tales como los factores de crecimiento. Tales reactivos pueden mezclarse en una única disolución tal como el kit Human Keratinocyte Growth Supplement (Cascade Biologics), por nombrar un ejemplo, o pueden complementarse individualmente. Tales reactivos incluyen, pero no se limitan a, factores de crecimiento (tales como, por ejemplo, factor de crecimiento epidérmico, factor 1 de crecimiento similar a la insulina, factor BB de crecimiento derivado de plaquetas, factor $\beta 1$ de crecimiento transformante, insulina), hormonas (tales como un extracto de pituitaria bovina), hidrocortisona, transferrina y similares, en cualquier combinación adecuada para inducir la expansión clónica de un tipo de célula dada. El término “expansión clónica” también incluye el cultivo de la célula *in vivo*, por ejemplo, mediante la inyección de las células en mamíferos, tales como seres humanos, ratones, ratas, simios inferiores, simios superiores, por nombrar solo unos pocos.

En otra realización más, la invención proporciona un procedimiento que comprende además:

(e) cultivar las células madre/progenitoras epiteliales o mesenquimatosas en condiciones que permiten la diferenciación de dichas células en células epiteliales y/o células mesenquimatosas; y

(f) aislar las células diferenciadas.

En otra realización más, la invención proporciona un procedimiento que comprende además:

(g) preservar las células madre/progenitoras epiteliales o mesenquimatosas aisladas para su uso posterior.

Los procedimientos y protocolos para preservar y almacenar células eucariotas y en particular células de mamífero, se conocen bien en la técnica (véanse, por ejemplo, Pollard, J.W. y Walter, J.M. (1997) *Basic Cell Culture Protocols, Segunda Edición*, Humana Press, Totowa, NJ; Freshney, R.I. (2000) *Culture of Animal Cell, Cuarta Edición*, Wiley-Liss, Hoboken, NJ). Cualquier procedimiento que mantenga la actividad biológica de las células madre/progenitoras epiteliales o mesenquimatosas aisladas puede utilizarse junto con la presente invención. En una realización preferida, las células madre/progenitoras se mantienen y se guardan usando criopreservación.

En consecuencia, la invención también se refiere a una célula progenitora/madre epitelial o mesenquimatosa derivada de la membrana amniótica del cordón umbilical por medio de los procedimientos anteriores. Además, la invención también se refiere a un banco de células que comprende o que consiste en una o más células progenitoras/madre que se han aislado como se describe aquí. Este banco de células progenitoras/madre epiteliales o mesenquimatosas puede ser autólogo para un individuo o combinado y posteriormente puede emplearse por diferenciación posterior para, por ejemplo, medicina regenerativa, reparación y regeneración tisular.

Según lo anterior, la invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende una célula madre/progenitora aislada de la membrana amniótica del cordón umbilical mediante el procedimiento de la invención anterior. La composición farmacéutica puede ser de cualquier tipo y normalmente comprende las células

madre/progenitoras o un extracto celular de las mismas junto con un vehículo/excipientes terapéuticamente aceptable adecuado. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica está adaptada para administración sistémica o tópica.

Una composición farmacéutica adaptada para administración tópica puede estar en forma líquida o viscosa. Ejemplos de la misma incluyen una pomada, una crema y una loción y similares. Ejemplos de las composiciones farmacéuticas que son adecuadas para el uso sistémico son composiciones líquidas en las que las células madre/progenitoras o el extracto celular se disuelven en un tampón que es aceptable, por ejemplo, para la inyección o infusión.

En consecuencia, la invención también se refiere a un uso de una célula madre/progenitora de la invención para tratar un sujeto que tiene un trastorno seleccionado del grupo que consiste en trastorno tisular, enfermedad neoplásica, enfermedad de la piel, deficiencia endocrina visceral y un trastorno neural. Este uso comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de una célula madre/progenitora aislada como se explica en el presente documento.

El trastorno tisular que va a tratarse puede ser una deficiencia del tejido congénita o adquirida. Ejemplos de deficiencia endocrina visceral que pueden tratarse con una célula de la invención incluyen, pero no se limitan a, diabetes mellitus asociada a deficiencia de insulina, deficiencia de testosterona, anemia, hipoglucemia, hiperglucemia, deficiencia pancreática, deficiencia suprarrenal y deficiencias tiroideas.

Ejemplos de trastornos neurales que pueden tratarse incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Lou Gehrig, enfermedad de Huntington y afecciones neoplásicas neurales.

Un ejemplo de una enfermedad de la piel es una herida o una parte dañada de la piel, por ejemplo, piel quemada por el sol. También se considera que el envejecimiento de la piel es una enfermedad de la piel en el presente documento. Así, la distribución tópica o similar de células madre/progenitoras de la invención, por ejemplo, como un constituyente en lociones o cremas o cualquier otro vehículo adecuado, puede usarse para la reparación de piel dañada por el sol y además puede retardar también el proceso de envejecimiento de la piel (propiedades anti-envejecimiento) mediante el reabastecimiento y así la fortificación, de los factores de crecimiento deficientes y los elementos peptídicos relacionados, sin los que se aceleraría el envejecimiento de la piel. Las células madre/progenitoras también pueden migrar hacia las regiones dañadas del cuerpo, tales como heridas superficiales, para formar los elementos celulares requeridos necesarios para los procesos reparadores locales (véanse *The Journal of Immunology*, 2001, 166:7556-7562; o *Internacional Journal of Biochemical and Cell Biology* 2004; 36:598-606).

La enfermedad neoplásica puede ser un cáncer, en particular ya que estudios recientes han demostrado que las células madre pueden dirigirse selectivamente al tejido tumoral neoplásico (*Journal of the National Cancer Institute* 2004; 96(21): 1593-1603) permitiendo la distribución dirigida de los agentes antineoplásicos tales como el interferón a los focos neoplásicos. El cáncer puede ser cualquier tipo de cáncer, incluyendo aquellos cánceres que son capaces de formar tumores sólidos, que varían de cáncer de la piel a cáncer de los órganos internos. Ejemplos de los cánceres que van a tratarse incluyen carcinoma de células escamosas, carcinoma ductal y lobular de mama, carcinoma hepatocelular, carcinoma nasofaríngeo, cáncer de pulmón, cáncer de huesos, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de la cabeza o el cuello, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer testicular, cáncer uterino, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de la uretra, cáncer del pene, cáncer de próstata, leucemias crónicas o agudas, tumores sólidos de la infancia, linfoma linfocítico, cáncer de vejiga, cáncer del riñón o del uréter, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, neoplasia del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, glioma del tronco encefálico, adenoma de la pituitaria, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, o cualquier combinación de tales cánceres, incluyendo formas diseminadas (en metástasis) de los mismos. En el caso de tratamiento de una enfermedad neoplásica, las células madre derivadas del líquido amniótico del cordón umbilical y/o sus extractos celulares desvelados en el presente documento pueden administrarse sistemáticamente bien como un tratamiento directo y/o como un vehículo portador. En el último caso de la terapia tumoral antineoplásica, las células comprenden un agente antineoplásico.

En otro uso farmacéutico, las células madre/progenitoras de la presente invención pueden usarse para terapia génica. Para este fin, las células pueden transformarse con un ácido nucleico que codifica la proteína que va a producirse en las células. El ácido nucleico puede introducirse dentro de una célula de la invención usando cualquiera de los diversos procedimientos que son muy conocidos para el experto, por ejemplo, usando un vector viral y/o una composición de transfección que contiene lípido, tal como IBAfect (IBA GmbH, Göttingen, Alemania), Eugene (Roche), GenePorter (Gene Therapy Systems), Lipofectamine (Invitrogen), Superfect (Qiagen), Metafecten (Biontex) o aquellos descritos en la solicitud PCT WO 01/015755. En una realización relacionada, las células de la invención, después de transformarse con un ácido nucleico que codifica un polipéptido de elección, puede usarse para la producción recombinante de este polipéptido.

Como se mencionó anteriormente, los extractos de células madre son ricos en una variedad de factores de crecimiento y péptidos que son relevantes para la fisiología de los tejidos normales. Tales factores de crecimiento y/o péptidos pueden ser deficientes en las partes expuestas del cuerpo, tales como la piel, que es la capa superficial de todos los seres humanos que protege el cuerpo de los elementos externos para el mantenimiento de la homeostasis interna. Por lo tanto, en otra realización, las células madre/progenitoras de la invención son adecuadas para el tratamiento y/o mantenimiento de la homeostasis interna.

En otra realización y en línea con la divulgación anterior, las células madre/progenitoras de la invención pueden usarse para la producción de cualquier molécula biológica. La molécula biológica puede ser, por ejemplo, cualquier molécula que sea producida de manera natural en las células o una molécula cuyo ácido nucleico se ha introducido dentro de las células mediante tecnología de ADN recombinante. Ejemplos de moléculas que pueden producirse por las células de la invención incluyen, pero no se limitan a, una proteína tal como una citocina, un factor de crecimiento tal como el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor beta de crecimiento transformante (TGF-beta), activina A, una proteína morfogenética ósea (BMP), PDGF o una hormona como insulina o eritropoyetina o una proteína transportadora tal como transferrina, un péptido tal como un factor de crecimiento u hormona (por ejemplo, hormona luteinizante (LH), hormona estimulante del folículo (FSH)), una molécula orgánica pequeña tal como una hormona esteroide, un oligo- o polisacárido, por ejemplo, heparina o sulfato de heparano (véanse, por ejemplo, los documentos WO 96/23003 o WO 96/02259 a este respecto), un proteoglicano, una glucoproteína tal como colágeno o laminina, o un lípido, por nombrar solo algunos pocos.

En otro aspecto y según enfoques recientes (véase, por ejemplo, Amit, M y col., Human feeder layers for human embryonic stem cells, Biol Reprod 2003; 68:2150-2156), las células madre/progenitoras descritas aquí pueden utilizarse como capa alimentadora para el cultivo de otras células madre embrionarias, en particular células madre embrionarias humanas. En una de estas realizaciones, las células de la presente invención son preferentemente de origen humano, ya que el uso de células humanas como capa alimentadora reduce al mínimo el riesgo de contaminación del cultivo celular con componentes derivados de animales tales como patógenos o inmunógenos de animales. A este respecto, debe observarse que las células de la invención pueden cultivarse en condiciones libres de suero. En consecuencia, emplear las células como capa alimentadora y cultivar el cultivo celular en medio libre de suero como el descrito más adelante en el presente documento, o en Draper y col. (Culture and characterization of human embryonic stem cell lines, Stem Cells Dev 2004, 13:325-336) o en la solicitud de patente internacional WO 98/30679, por ejemplo.

En este contexto, se observa que en la cirugía de trasplante y la terapia basada en células son cruciales altas cantidades de células de pase bajo con una proporción mínima de células senescentes (es decir, una gran proporción de células de alta calidad) y se requiere que se deriven dentro del tiempo más corto posible durante la expansión celular. Por ejemplo, las células madre mesenquimatosas de la médula ósea y la sangre del cordón son de cantidad baja y por lo tanto, requieren expansión durante muchos pases durante un periodo de tiempo prolongado con el fin de lograr el número suficiente de células requeridas para el trasplante de células. Sin embargo, las células de pase alto tienden a deteriorarse en calidad y pueden conducir a senescencia celular o a transformación cancerosa. Se ha encontrado aquí que pueden obtenerse altas cantidades de células de la presente invención mediante bajos números de pases usando una técnica de explante repetitiva. Así la presente invención también se refiere a un procedimiento de cultivo de células madre/progenitoras de la invención, en el que este procedimiento comprende:

Obtener un explante tisular de la membrana amniótica aislada del cordón umbilical;

Cultivar el explante tisular en medio de cultivo y condiciones de cultivo adecuadas durante un periodo de tiempo adecuado,

Exponer opcionalmente el explante tisular a medio de cultivo recién preparado y continuar el cultivo en condiciones adecuadas durante un periodo de tiempo adecuado (ver la Fig. 15).

El cultivo puede llevarse a cabo durante tantos ciclos (pases) como se desee y detenerse una vez se ha obtenido el número deseado de células. La exposición del explante tisular al cultivo recién preparado puede llevarse a cabo retirando el medio de cultivo celular usado del recipiente usado para cultivar las células y añadir el medio recién preparado a ese recipiente. En vez de sustituir el medio en el recipiente usado, la exposición a los medios de cultivo recién preparados puede lograrse transfiriendo el explante tisular a un recipiente nuevo que está lleno de medios de cultivo. El explante tisular usado para el cultivo/propagación de las células puede obtenerse mediante cualquier procedimiento adecuado, por ejemplo, mediante la "técnica de explante tisular directo" como se explicó anteriormente (en la que el tejido se dispone inicialmente en medio sin enzimas y a continuación en condiciones cuidadosas las células se separan de la masa tisular principal por sí mismas y las células se recogen a continuación para la recolección).

El cultivo de los explantes tisulares puede llevarse a cabo en cualquier medio que sea adecuado para el cultivo de células de mamífero. Ejemplos incluyen los medios convencionales y comercialmente disponibles que se han facilitado anteriormente con respecto al cultivo o la expansión clónica de las células de la invención, tales como, pero no se limitan a, medio de queratinocitos KGM® (Cambrex), medio de células epiteliales mamarias MEGM (Cambrex), medio EpiLife

(Cascade Biologics), medio 171 (Cascade Biologics), DMEM, DMEM-F12 o medio RPMI. El cultivo se lleva normalmente a cabo a condiciones (temperatura, atmósfera) que se usan normalmente para el cultivo de células de las especies de las que se derivan las células, por ejemplo, a 37 °C en atmósfera de aire con 5 % de CO₂. En una realización, el cultivo se lleva a cabo usando medio libre de suero, en particular libre de suero bovino. El cultivo (en un pase) se realiza durante cualquier tiempo adecuado que las células necesiten para el crecimiento, normalmente, pero ni mucho menos limitado a, durante aproximadamente 1 a varios días, por ejemplo, a aproximadamente 7 o aproximadamente 8 días.

Las invenciones descritas ilustrativamente en el presente documento pueden ponerse adecuadamente en práctica en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, no específicamente descrito en el presente documento. Así, por ejemplo, los términos “que comprende”, “que incluye”, “que contiene”, etc., serán leídos extensamente y sin limitación. Adicionalmente, los términos y expresiones empleados en el presente documento han sido usados como términos de descripción y no de limitación y no hay intención en el uso de tales términos y expresiones de excluir cualquier equivalente de las características mostradas y descritas, o porciones de las mismas, pero se reconoce que son posibles diversas modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada. Así, debe entenderse que, aunque la presente invención se ha desvelado específicamente por realizaciones preferidas y características opcionales, la modificación y variación de las invenciones integradas a este respecto divulgadas en el presente documento pueden recurrirse por aquellos expertos en la técnica y que tales modificaciones y variaciones se considera que están dentro del alcance de esta invención.

La invención se ha descrito ampliamente y genéricamente en el presente documento. Cada una de las especies y agrupamientos subgenéricos más estrechos que se encuentren dentro de la divulgación genérica también forman parte de la invención. Esto incluye la descripción genérica de la invención con una condición o limitación negativa que elimina cualquier materia del género, independientemente de si el material extirpado es o no específicamente indicado en el presente documento.

Otras realizaciones están dentro de las siguientes reivindicaciones y ejemplos no limitantes. Además, donde las características o aspectos de la invención se describen en términos de grupos de Markush, aquellos expertos en la técnica reconocerán que la invención también se describe con esto en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo de Markush.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Recogida de tejido del cordón umbilical

El tejido del cordón umbilical se recoge inmediatamente después del nacimiento del bebé. El espécimen se enjuaga para limpiarlo e inmediatamente se transfiere a una botella de vidrio estéril de 500 ml que contiene el medio de transporte de cultivo (medio L-15 complementado con 50 UI/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina, 250 µg/ml de fungizona, 50 µg/ml de gentamicina; todos los reactivos adquiridos de Invitrogen) antes del transporte al laboratorio. En el laboratorio, la extracción de las células madre se realiza en una campana de flujo laminar en condiciones estériles. El espécimen se transfiere primero a una bandeja de acero inoxidable estéril. Toda la sangre remanente en los vasos sanguíneos se extrae mediante lavados múltiples con jeringa usando solución salina caliente tamponada con fosfato (PBS) complementada con 5 UI/ml de heparina (de Sigma). Se usa PBS puro sin heparina en los lavados finales. El espécimen de tejido del cordón umbilical se corta a continuación en trozos de 2 cm de longitud y se transfiere a placas de cultivo celular de 10 cm de diámetro, en las que se realizan el lavado y desinfección adicionales con 70 % de etanol, seguido de lavados múltiples usando PBS que contiene una mezcla de antibióticos (50 UI/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina, 250 µg/ml de fungizona, 50 µg/ml de gentamicina; todos adquiridos de Invitrogen) hasta que la solución se vuelve clara.

Ejemplo 2: Separación/cultivo de células

La disección del tejido del cordón umbilical se realiza primero para separar la membrana amniótica del cordón umbilical de la gelatina de Wharton (es decir, la matriz del cordón umbilical) y otros componentes internos. La membrana amniótica aislada se corta a continuación en trozos pequeños (0,5 cm x 0,5 cm) para el aislamiento de las células. El explante se realiza colocando los trozos de membrana amniótica del cordón umbilical sobre placas de cultivo de tejidos a diferentes condiciones de cultivo celular para el aislamiento de tanto las células madre epiteliales como mesenquimatosas.

Para la separación/cultivo de células mesenquimatosas, los explantes se sumergieron en 5 ml de DMEM (Invitrogen) complementado con 10 % de suero bovino fetal (Hyclone) (DMEM/10 % de SBF) y se mantuvieron en una estufa de incubación de cultivo de células con CO₂ a 37 °C. El medio se cambió cada 2 o 3 días. El crecimiento celular se monitorizó por microscopía óptica. Las células en crecimiento se recogieron por tripsinización (0,125 % de tripsina/0,05 % de EDTA) para la expansión posterior y la criopreservación usando DMEM/10 % de SBF.

Para la separación/cultivo de células epiteliales, las superficies de plástico del cultivo celular se recubrieron con mezclas de colágeno 1/colágeno 4 (1:2) antes de colocar las muestras de tejido sobre la superficie. Las muestras de tejido se sumergieron en 5 ml de medio EpiLife o medio 171 (ambos de Cascade Biologics). El medio se cambió cada 2 o 3 días.

El crecimiento celular de los explantes de cultivo de tejido se monitorizó por microscopía óptica. Las células en crecimiento se recogieron por tripsinización (0,125 % de tripsina/0,05 % de EDTA) usando el medio EpiLife o medio 171.

Para el procedimiento de extracción enzimática de células, la membrana amniótica del cordón umbilical se dividió en trozos pequeños de 0,5 cm x 0,5 cm y se digirió en disolución de collagenasa tipo 1 al 0,1 % (p/v) (Roche Diagnostics) a 37 °C durante 6 horas. Las muestras se agitaron con vórtex cada 15 minutos durante 2 minutos. Las células se recogieron mediante centrifugación a 4000 rpm durante 30 minutos. Se emplearon dos enfoques diferentes para aislar tanto células madre epiteliales como mesenquimatosas.

Para el aislamiento de las células madre epiteliales, los sedimentos celulares se resuspendieron en medio EpiLife o medio 171 (ambos de Cascade Biologics) complementado con 50 µg/ml de factor 1 de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), 50 µg/ml de factor BB de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB), 5 µg/ml de factor β1 de crecimiento transformante (TGF-β1) y 5 µg/ml de insulina (todos obtenidos de R&D Systems), se contaron y se sembraron sobre placas de cultivo de tejido de 10 cm previamente recubiertas con mezclas de colágeno 1/colágeno 4 (1:3; Becton Dickinson) a una densidad de 1×10^6 células/placa. Después de 24 horas, las células adheridas se lavaron con PBS caliente y el medio se substituyó con medio EpiLife añadido con suplemento o medio 171. El medio se cambió cada 2 o 3 días. El crecimiento celular y la formación clónica en expansión se monitorizaron por microscopía óptica. A una confluencia de aproximadamente el 70 %, las células se subcultivaron por tripsinización (0,125 % de tripsina/0,05 % de EDTA) para la expansión y crio-preservación posteriores.

Para el aislamiento de células madre mesenquimatosas, los sedimentos celulares se resuspendieron en DMEM/10 % de SBF, se contaron y se sembraron sobre placas de cultivo de tejido de 10 cm a una densidad de 1×10^6 células/placa. El medio de cultivo se cambió cada 2 o 3 días. El crecimiento y la expansión celular se monitorizaron por microscopía óptica. A una confluencia de aproximadamente el 90 %, las células se subcultivaron como se ha explicado resumidamente anteriormente.

Para el cultivo de las células madre epiteliales y mesenquimatosas sobre la capa alimentadora, la membrana de revestimiento del cordón umbilical se digirió por tratamiento con collagenasa, se contó y se sembró sobre placas de cultivo de tejido de 10 cm recubiertas con fibroblastos 3T3 letalmente irradiados o tratados con mitomicina C (capa alimentadora) en medio de Green. El medio de cultivo se cambió cada 2 o 3 días. La formación de colonias se monitorizó por microscopía óptica y se fotografió.

Ejemplo 3: Identificación de células madre/progenitoras

Células epiteliales: La **Fig. 1** muestra fotografías de células epiteliales en crecimiento de la membrana amniótica del cordón umbilical preparadas por el procedimiento que usa explante tisular (40X aumentos). Se tomaron fotografías en el día 2 (**Fig. 1A**) y en el día 5 (**Figura 1B, C**) del cultivo de tejido. El análisis de morfología celular demostró células similares a las epiteliales de forma poliédrica. La digestión enzimática de los segmentos del cordón umbilical produjo similarmente (**Fig. 2**) células epiteliales en el día 2 (**Fig. A, C**) y en el día 5 (**Figura B, D**) (40X aumentos). La **Fig. 7** muestra imágenes de la formación de colonias de células madre epiteliales de membrana amniótica del cordón umbilical cultivadas sobre capa alimentadora usando el procedimiento de Green (40X aumentos). Una colonia de células similares a las epiteliales de forma poliédrica se expandió rápidamente del día 3 al día 7.

Células mesenquimatosas: Se observó el crecimiento de las células mesenquimatosas explantadas de la membrana amniótica del cordón umbilical tan pronto como 48 horas después de la colocación en placas de cultivo de tejidos usando DMEM complementado con 10 % de suero de ternera fetal (STF) como medio de cultivo (**Fig. 3A, C**) (40X aumentos). Las células se caracterizaron por su morfología fusiforme y migraron y se expandieron tanto fácil como rápidamente *in vitro*, asemejándose estrechamente a los fibroblastos (**Fig. 3B, D**) (40X aumentos). Se notaron observaciones similares en el grupo de células aisladas mediante digestión enzimática con collagenasa (**Fig. 4**). La **Fig. 4A** muestra células mesenquimatosas aisladas de membrana amniótica del cordón umbilical en el día 2. Se observó proliferación celular en el día 5 (**Fig. 4B**) (40X aumentos). Las Figuras 6 y 8 muestran imágenes de la formación de colonias de células madre mesenquimatosas de la membrana amniótica del cordón umbilical, cultivadas sobre la condición de capa no alimentadora y de capa alimentadora en DMEM/10 % de STF (40X aumentos). Las colonias de las células similares a fibroblastos en forma alargada se expandieron rápidamente del día 3 al día 7.

El análisis de transferencia Western (**Fig. 9**) muestra que las células madre mesenquimatosas de la membrana amniótica del cordón umbilical (UCMC) y las células epiteliales del cordón umbilical (UCEC) aisladas según la invención expresaron el gen POU5f1 que codifica el factor de transcripción octámero-4 (Oct-4), un marcador específico de células madre embrionarias (véase Niwa, H., Miyazaki, J. y Smith, A.G. (2000). *Nat. Genet.* 24, 372-376). Así, este análisis indica las propiedades similares a las embrionarias de estas células madre. Estas células también expresaron en gran medida los otros factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento similar a la placenta PLGF, STAT3, factor de células madre (SCF), factor de crecimiento derivado de hepatoma (HDGF), factor 2 de crecimiento de fibroblastos (FGF-2), factor de

crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), actina alfa de músculo liso (α -SMA), fibronectina, decorina, sindecano-1,2,3,4. En la **Fig. 9**, la expresión de estos genes se compara con fibroblastos dérmicos humanos, células mesenquimatosas de la médula ósea (BMSC) y células mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo (ADMC). La **Fig. 9** también muestra activina A y folistatina altamente secretadas (estas dos proteínas son bien conocidas por promover la reparación y regeneración tisular, la angiogénesis aumentada y mantienen el cultivo de células madre embrionarias, de modo que la expresión de los genes respectivos es un signo de las propiedades embrionarias y la capacidad de las células para diferenciarse) detectadas por ensayo de ELISA en sobrenadantes de cultivo de células madre mesenquimatosas y epiteliales de cordón umbilical en comparación con las células madre derivadas de médula ósea, de tejido adiposo, fibroblastos dérmicos humanos y queratinocitos epidérmicos. Por tanto, estos resultados indican que las células de la invención son candidatos prometedores en la aplicación terapéutica de estas células en áreas tales como la medicina regenerativa, medicina del envejecimiento, reparación tisular e ingeniería tisular.

Las células mesenquimatosas se caracterizaron adicionalmente por análisis de citocinas y factores de crecimiento secretados en comparación con las células madre mesenquimatosas de médula ósea humana. Las células madre epiteliales del cordón umbilical (UDEC) se analizaron en comparación con los queratinocitos epidérmicos humanos. Este análisis se llevó a cabo como sigue: Brevemente, UMMC, UDEC, fibroblastos dérmicos, células mesenquimatosas de la médula ósea, queratinocitos epidérmicos se cultivaron en medios de cultivo hasta el 100 % de confluencia (37 °C, 5 % de CO₂) y a continuación se sincronizaron en medio de inanición (DMEM libre de suero) durante 48 horas. Al siguiente día, el medio se sustituyó con DMEM libre de suero, recién preparado y las células se cultivaron a continuación durante otras 48 horas. Los medios condicionados se recogieron, se concentraron y se analizaron usando una matriz de citocinas (RayBiotech, Inc., GA, EE.UU.).

Los resultados de este análisis muestran que las UCMC secretan interleucina 6 (IL-6); (MCP1); factor de crecimiento de hepatocitos (HGF); interleucina 8 (IL8); sTNFR1; GRO; TIMP1; TIMP2; TRAILR3; uPAR; ICAM1; IGFBP3; IGFBP6 (**Fig. 11**), mientras que UDEC secretan IGFBP-4; PARC; EGF; IGFBP-2; IL-6; angiogenina; GCP-2; IL1 R α ; MCP-1; RANTES; SCF; TNF β ; HGF; IL8; sTNFR; GRO; GRO- α ; anfregulina; IL-1 R4/ST2; TIMP1; TIMP2; uPAR; VEGF (**Fig. 12**).

En consecuencia, esto muestra que ambos tipos celulares secretan grandes cantidades de citocinas y factores de crecimiento que desempeñan funciones importantes en la biología del desarrollo, la homeostasis de tejidos, la reparación y la regeneración tisular y la angiogénesis. Esto demuestra además la versatilidad de las células de la invención para su uso en aplicaciones terapéuticas respectivas.

Además, las células de la invención se examinaron adicionalmente con respecto a su perfil de seguridad usando el ensayo de formación de teratoma de ratón como indicador. Se usaron seis ratones SCID en estos experimentos. Se inyectó una suspensión de más de 2 millones de UCMC con una aguja 25G estéril dentro del músculo del muslo de cada ratón SCID. Los animales se mantuvieron hasta 6 meses y se evaluó la formación del tumor. No se observó formación del tumor en estos ratones (datos no mostrados). Esto indica que las células de la invención son seguras y no tienen ninguna capacidad para formar tumores, benignos o de otro modo.

Ejemplo 4: Cultivo de células madre/progenitoras en medio libre de suero

Las células UCMC se cultivaron en DMEM que contenía 10 STF y en medios libres de suero, PTT-1, PTT-2 y PTT-3. Los tres medios PTT-1, PTT-2 y PTT-3 se prepararon por uno de los autores de la presente invención, el Dr. Phan. En resumen, estos 3 medios no contienen suero bovino o humano fetal, pero contienen diferentes citocinas y factores de crecimiento tales como IGF, EGF, TGF-beta, activina A, BMP, PDGF, transferrina e insulina. Los componentes del factor de crecimiento varían entre los medios para evaluar las características de crecimiento diferencial. El cultivo se llevó a cabo como sigue: se añadieron diferentes proporciones de los factores de crecimiento y citocinas a medio basal. Las UCMC se descongelaron y se mantuvieron en estos medios durante 10 días. La proliferación celular se monitorizó por microscopía óptica.

La **Fig. 13** muestra el buen crecimiento de UCMC en los 4 grupos de medios diferentes (**Fig. 13-1 a Fig. 13-5**), en los que la morfología de las células UCMC es diferente dependiendo de la relación o proporción de citocinas o factores de crecimiento presentes en los medios respectivos. Por el contrario, las células mesenquimatosas derivadas de la médula ósea y de tejido adiposo no crecieron bien en estos medios libres de suero (**Fig. 13-6 y Fig. 13-7**). En consecuencia, el buen crecimiento de las UCMC demuestra la robustez de las células de la invención y su alta viabilidad, indicando que sus características de crecimiento son superiores a las fuentes convencionales de células madre mesenquimatosas como las células mesenquimatosas derivadas de la médula ósea y derivadas de tejido adiposo. A este respecto, merece la pena indicar que se usó medio libre de suero (bovino) en esos experimentos y que la mayoría de las células mesenquimatosas humanas no crecen bien en sistemas de medios libres de suero. Así, el usar las células de la invención junto con las tecnologías de medios libres de suero definidas es una gran ventaja en la terapia celular, ya que se eliminan los riesgos de usar suero bovino fetal para el cultivo y la expansión de células. (Aunque se ha puesto en práctica el uso de suero bovino durante un largo tiempo y normalmente optimiza el crecimiento celular, han aumentado los problemas de su uso en cuanto a la transmisión de zoonosis como la encefalopatía espongiforme bovina (enfermedad de las vacas locas)).

Ejemplo 5: Caracterización del perfil de expresión génica de células madre epiteliales y mesenquimatosas del cordón umbilical

Se analizó el perfil de expresión génica de las células madre epiteliales y mesenquimatosas del cordón umbilical usando una micromatriz de ADN. Para este fin, las UCMC y UCEC se cultivaron en medios de crecimiento a 37 °C, 5 % de CO₂ hasta el 100 % de confluencia. Las células se sincronizaron en medio basal durante 48 horas, a continuación se sustituyeron con medio basal recién preparado durante otras 48 horas. Se recogió el ARN total y se envió a Silicon Genetics Microarray Service. El análisis de datos se realizó usando GeneSpring 7.2). La **Fig. 14** resume la expresión génica global. Las UCEC expresaron un total de 28055 genes y las UCMC expresaron un total de 34407 genes. Hay 27308 genes que se solapan que expresan en ambos tipos celulares. 747 genes expresados fueron únicos para UCEC y 7099 genes expresados fueron únicos para UCMC. Los genes seleccionados de interés se presentan en la **Fig. 14**.

Ambos tipos de células madre expresaron 140 genes relacionados con células madre embrionarias y el desarrollo embrionario, apoyando además que las células de la invención tienen propiedades similares a las células madre embrionarias: Nanog; proteína fetal alfa; factor 3 de transcripción de leucemia de células Pre-B; laminina alfa 5; 1 similar al antígeno carcinoembrionario; 2 que contiene dominio de abhidrolasa; 3 similar a delta (*Drosophila*); similar a Muscle-blind (*Drosophila*); locus complejo de GNAS; molécula 3 de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario; tioesterasa 3 de palmitoil-proteína; beta-1-glucoproteína 2 específica del embarazo; 1 similar al antígeno carcinoembrionario; desarrollo de ectodermo embrionario, cinasa de cremallera de leucina embrionaria materna; hormona 2 de somatomamotropina coriónica; caja D3 de cabeza de tenedor; homólogo de borde radical (*Drosophila*); miembro 1B de la familia de cinesina; miosina; polipéptido 3 pesado; músculo esquelético, embrionario; malformación de mano/pie dividido (ectrodactilia) tipo 3; miembro 3 de la familia del dominio de TEA; laminina, alfa 1; hormona 1 de somatomamotropina coriónica; lactógeno placentario; receptor 1 de la hormona de liberación de corticotropina; factor embrionario tirotrófico; translocador 2 nuclear del receptor de aril-hidrocarburo; proteína de la membrana relacionada con frizzled; colágeno de neuregulina 1, tipo XVI, alfa 1; neuregulina 1; hormona 1 de somatomamotropina coriónica (lactógeno placentario); repetición de triplete CUG, proteína 1 de unión al ARN; similar a Bistina de la hormona 1 de somatomamotropina coriónica (lactógeno placentario); inhibidor de la familia de MyoD; 2 inducida por ácido retinoico; locus complejo de GNAS; factor 4 de transcripción de leucemia de células pre-B; laminina, alfa 2 (merosina, distrofia muscular congénita); SMAD, madres contra el homólogo 1 de DPP (*Drosophila*); secuencia transcrita por *Homo sapiens* con similitud moderada a la proteína pir:D28928 (*H. sapiens*), beta-1-glucoproteína 1B específica del embarazo D28928, abortivo-humano (fragmento); miembro 1B de la familia de cinesina; 4 similar a Bruno, proteína de unión al RNA (*Drosophila*); proteína específica del cerebro embrionario; inhibidor del crecimiento inducido por el embarazo; SMAD, madres contra el homólogo 5 de DPP (*Drosophila*); hormona 2 de somatomamotropina coriónica; polipéptido 1 activante de la adenilato-ciclasa (pituitaria); molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario; laminina, alfa 3; proteína O-fucosiltransferasa 1; Jagged 1 (síndrome de Alagille); homólogo 1 trenzado de gastrulación (*Drosophila*); 3 similar a ELAV (letal embrionario, visión anormal, *Drosophila*) (antígeno C humano); factor embrionario tirotrófico; familia 43 de los transportadores de soluto, miembro 3; inversina; nefronofitosis 2 (infantil); inversión de la vuelta embrionaria; inversina de *Homo sapiens* (INVS), variante 2 del transcrito, ARNm; secuencias transcritas de *Homo sapiens*; homeocaja D8; sustrato asociado a Fyn embrionario; 1 similar a ELAV (letal embrionario, visión anormal, *Drosophila*) (antígeno R humano); que contiene el dominio básico de hélice-bucle-hélice, clase B, 2; receptor de oxitocina; factor 1 de crecimiento derivado de teratocarcinoma; tirosina cinasa 1 relacionada con Fms (factor de crecimiento endotelial vascular/receptor del factor de permeabilidad vascular); adrenomedulina; repetición en triplete 6-CUG del coactivador del receptor nuclear, proteína 1 de unión al ARN; homólogo 1 trenzado de gastrulación (*Drosophila*); molécula 4 de adhesión celular relacionada con antígeno carcinoembrionario; proteína tirosina fosfatasa, tipo receptor, R; ortólogo de la región mínima de letalidad embrionaria Acrg (ratón); receptor A3 de EPH; 1 similar a delta (*Drosophila*); factor LHRH embrionario nasal; 1 similar a CP2 del factor de transcripción; malformación de mano/pie dividido (ectrodactilia) tipo 3; Jagged 2; secuencia transcrita de *Homo sapiens*; neuregulina 1; malformación de mano/pie dividido (ectrodactilia) tipo 1; familia 43 de transportadores de soluto, miembro 3; hidroxilacil-coenzima A deshidrogenasa/3-cetoacil-coenzima A tiolasa/enoil-coenzima A hidratasa (proteína trifuncional), subunidad alfa; fucosiltransferasa 10 (alfa(1,3) flucosiltransferasa); ortólogo de la región mínima de letalidad embrionaria Acrg (ratón); molécula 7 de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario; nucleofosmina/nucleoplasmina 2; fragmento Fc de IgG, receptor, transportador, alfa; homólogo 1 trenzado de gastrulación (*Drosophila*); *Homo sapiens* similar a la clasificación 35 de la proteína vacuolar; materno-embrionario 3 (LOC146485), ARNm; 2 que contiene dominio de abhidrolasa; homólogo de T, brachyury (ratón); dominio 10 de desintegrina y de metaloproteinasas; proteína ribosómica L29; enzima 2 de conversión de endotelina; 1 similar a ELAV (letal embrionario, visión anormal, *Drosophila*) (antígeno R humano); trofinina; homeocaja B6; laminina, alfa 4; homeocaja B6; proteína hipotética FLJ13456; NACHT, 5 que contiene repetición rica en leucina y PYD, 1 similar a ELAV (letal embrionario, visión anormal, *Drosophila*) (antígeno R humano); factor 1 de la transcripción de células embrionarias no diferenciadas; proteína A plasmática asociada al embarazo, papalisina 1; secretoglobina, familia 1A, miembro 1 (uteroglobina); hormona similar a la hormona paratiroidea; molécula 1 de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario (glucoproteína biliar); laminina, alfa 1.

Ambos tipos de células madre también expresaron miles de genes relacionados con la biología del desarrollo, el

crecimiento y la diferenciación celular, la homeostasis celular, la reparación y regeneración de células y tejidos. Ejemplos de tales factores de crecimiento y sus receptores es como sigue: (G-CSF, FGF, IGF, KGF, NGF, VEGF, PIGF, Angiopoyetina, CTGF, PDGF, HGF, EGF, HDGF, TGF-beta, activinas e inhibinas, follistatina, BMPs, SCF/c-Kit, LIF, WINT, SDF, oncostatina M, interleucinas, quimiocinas y muchas otras); MMP, matrices extracelulares de TIMP (colágenos, lamininas; fibronectinas, vitronectinas, tenascinas, integrinas, sindecanos, decorina, fibromoludina, proteoglicanos, Sparc/osteonectina, mucina, netrina, glipicano, proteína asociada al cartilago, matrilina, hialuronano, fibulina, ADAMTS, biglicano, discoidina, componentes de desmosoma, ICAMs, cadherinas, cateninas y muchas otras); citoqueratinas.

Hay grupos de genes presentes únicamente en UCMC. Estos genes están relacionados con los siguientes: procesos fisiológicos normales (factor 1 de crecimiento similar a la insulina (somatomedina C); 4 similar a insulina (placenta); relaxina 1; plasminógeno; factor 1 de crecimiento similar a la insulina (somatomedina C); 5 similar a insulina; factor 1 de crecimiento similar a la insulina (somatomedina C); factor 2 de crecimiento similar a la insulina (somatomedina A); homeostasis (1 similar a spokehead radial; hemocromatosis; ligando 5 de la quimiocina (motivo C-C); receptor A de la interleucina 31; ligando 12 de la quimiocina (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células del estroma); subfamilia 3 del receptor nuclear, grupo C, miembro 2; hemocromatosis; ligando 23 de la quimiocina (motivo C-C); ligando 23 de la quimiocina (motivo C-C); ferritina mitocondrial; receptor activado proliferativo del peroxisoma, gamma, coactivador 1, alfa; tensioactivo, proteína D asociada al pulmón; ligando 11 de la quimiocina (motivo C-C); ligando 3 de la quimiocina (motivo C-C); homólogo 2 de Egl nueve (*C. elegans*); receptor activado proliferativo del peroxisoma, gamma, coactivador 1, beta; ligando 1 de la quimiocina (motivo C-C); ligando 12 de la quimiocina (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células del estroma), ATPasa, transporte de Na⁺/K⁺, polipéptido alfa 2 (+); ligando 2 de la quimiocina (motivo C); hemopexina; receptor 3 de rianodina, morfogénesis (espectrina, alfa, eritrocítica 1 (eliptocitosis 2); homeocaja D3; homólogo 1 ausente de los ojos (*Drosophila*); familia de genes homólogos a Ras, miembro J; transcrito 1 específico de leucocitos; receptor de ectodisplasia A2; glipicano 3; gen 7 de la caja apareada; corina, serina proteasa; Dishevelled, homólogo 1 de dsh (*Drosophila*); familia de genes homólogos de Ras, miembro J; T-caja 3 (síndrome mamario ulnar); beta-1,4-N-acetilgalactosaminiltransferasa de condroitina; beta-1,4-N-acetilgalactosaminiltransferasa de condroitina; SRY (región Y de determinación del sexo)-caja 10; miosina, polipéptido pesado 9, no muscular; receptor de hormona luteinizante/coriogonadotropina; homólogo del borde radical (*Drosophila*); proteína 5 secretada relacionada con frizzled; familia del sitio de integración de MMTV tipo Wingless, miembro 11; homólogo 2 ausente de los ojos (*Drosophila*); similar a Muscle-blind (*Drosophila*); T-caja 5; 1 similar a Mab-21 (*C. elegans*); 2 específico de la detención del crecimiento; peine sexual sobre el homólogo 1 de pata intermedia (*Drosophila*); T-caja 6; proteína 1 de LIM de unión a filamina; molécula de adhesión a células de melanoma; homólogo trenzado 1 (acrocefalosindactilia 3; síndrome de Saethre-Chotzen) (*Drosophila*); homeocaja A11; queratocano; factor 1 de crecimiento de fibroblastos (ácido); carboxipeptidasa M; proteína efectora CDC42 (unión a la GTPasa Rho) 4; factor 1 de transcripción de homeocaja LIM, beta; homólogo 1 dentado; carboxipeptidasa M; factor 8 de crecimiento de fibroblastos (inducido por andrógenos); factor 18 de crecimiento de fibroblastos; transcrito 1 específico de leucocitos; endotelina 3; factor 1 de transcripción de homeodominio similar al apareado; desarrollo embrionario (beta-1-glucoproteína 3 específica del embarazo; 4 similar a ELAV (letal embrionario; visión anormal, *Drosophila*) (antígeno D humano); receptor 10 acoplado a la proteína G; receptor de ectodisplasia A2; casete de unión a ATP, subfamilia B (MDR/TAP), miembro 4; beta-1-glucoproteína 11 específica del embarazo; factor LHRH embrionario nasal; relaxina 1; homólogo 4 de Notch (*Drosophila*); beta-1-glucoproteína 6 específica del embarazo; pih-2P; proteína relacionada con el síndrome de hipertensión inducida por el embarazo de *Homo sapiens* (PIH2); glucoproteína oviductal 1, 120 kDa (mucina 9, oviductina); proteína endometrial asociada al progestágeno; miosina, polipéptido 4 ligero, alcali; atrial, embrionario; prolactina; homólogo 4 de Notch (*Drosophila*); factor 1 de transcripción de leucemia de células Pre-B; homólogo del borde radical (*Drosophila*); hormona de liberación de corticotropina; subfamilia 3 de receptores nucleares, grupo C, miembro 2; neuregulina 2; similar a Muscle-blind (*Drosophila*); miosina, polipéptido ligero 4, alcali, embrionario; ADNc FLJ27401 fis de *Homo sapiens*, clon WMC03071; extraembrionario, espermatogénesis similar a homeocaja 1; 4 similar a insulina (placenta); gen de la glucoproteína (PSG12) específica del pseudo-embarazo procesado por humanos, exón B2C que contiene regiones no traducidas de 3' de 2 sitios de corte y empalme alternativos C1 y C2; tirosina cinasa 1 relacionada con Fms (receptor del factor de crecimiento endotelial vascular/factor de permeabilidad vascular); factor 1 de la transcripción de leucemia de células pre-B; beta-1-glucoproteína 3 específica del embarazo; molécula 1 de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario (glucoproteína biliar), sulfatasa esteroide (microsómica); arilsulfatasa C, isozima S; homeocaja B6; proteína O-fucosiltransferasa 1; factor 1 de transcripción de homeocaja LIM, beta; molécula 1 de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario (glucoproteína biliar); hormona estimulante del folículo, polipéptido beta; angiotensinógeno (inhibidor de la serina (o cisteína) proteinasa, clado A (antiproteinasa alfa-1, antitripsina), miembro 8); molécula 6 de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario (antígeno de reacción cruzada no específica); proteína cinasa C, proteína de enlace alfa; miembro 10 de la subfamilia de colectina (lectina tipo C); laminina, alfa 1), espacio extracelular (carboxilesterasa 1 (serina esterasa 1 de monocitos/macrófagos); factor 5 de crecimiento de fibroblastos; progastricsina (pepsinógeno C); antígeno 11 asociado al semen; proproteína convertasa subtilisina/quexina tipo 2; proteína 2 de unión al hialuronano; dominio Sema, dominio de inmunoglobulina (Ig), dominio básico corto, secretado (semaforina) 3F; interleucina 2; similar a quimotripsina; enfermedad de Norrie (pseudoglioma); mucina 5, subtipos A y C, traqueobronquial/gástrico; carboxipeptidasa B2 (plasma, carboxipeptidasa U); homólogo del borde radical (*Drosophila*);

beta-1-glucoproteína 11 específica del embarazo; meprina A, alfa (hidrolasa peptídica PABA); taquicinina, precursor 1 (sustancia K, sustancia P, neurocinina 1, neurocinina 2, neuromedina L, neurocinina alfa, neuropéptido K, neuropéptido gamma); factor 8 de crecimiento de fibroblastos (inducido por andrógeno); factor 13 de crecimiento de fibroblastos; hemopexina; cáncer de mama 2, aparición temprana; factor 14 de crecimiento de fibroblastos; retinoesquisis (ligado a X, juvenil) 1; 1 similar a quitinasa 3 (glucoproteína 39 de cartílago); distonina; secretoglobina, familia 1D, miembro 2; nogina; dominio 2 del núcleo de cuatro disulfuros de WAP; similar al antígeno CD5 (familia rica en cisteína del receptor depurador); proteína 1 que responde a Scrapie; homólogo de gremlina 1, superfamilia del nudo de cisteína (*Xenopus laevis*); interleucina 16 (factor quimioatrayente de linfocitos); ligando 26 de la quimiocina (motivo C-C); nucleobindina 1; factor 18 de crecimiento de fibroblastos; proteína 1 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina; tensioactivo, proteína A1 asociada al pulmón; homólogo de 1 similar a delta (*Drosophila*); transcrito regulado por cocaína y anfetamina; meprina A, beta; interleucina 17F; factor H del complemento; proteína 2 secretora rica en cisteína; distonina; dominio 1 del núcleo de cuatro disulfuros de WAP; prolactina; tensioactivo, proteína B asociada al pulmón; factor 5 de crecimiento de fibroblastos; homólogo 2 de Dickkopf (*Xenopus laevis*); antígeno 11 asociado al semen; ligando 11 de la quimiocina (motivo C-C); meprina A, alfa (péptido hidrolasa de PABA); 2 similar a la quitinasa 3; factor de crecimiento inducido por C-fos (factor de crecimiento endotelial vascular D), ligando 4 de la quimiocina (motivo C-C); receptor del virus de la poliomiéltis; hialuronoglucosaminidasa 1; glucoproteína oviductal 1, 120 kDa (mucina 9, oviductina); ligando 9 de la quimiocina (motivo C-X-C); proteína 5 secretada relacionada con frizzled; amelogenina (amelogénesis imperfecta 1, ligada a X); relaxina 1; Sparc/osteonectina, dominios similares a cwc y kazal de proteoglicano (testicano); ligando 26 de la quimiocina (motivo C-C); factor 1 de crecimiento de fibroblastos (ácido); 2 similar a angiopoyetina; cinasa 1 de tirosina relacionada con Fms (receptor del factor de crecimiento endotelial vascular/factor de permeabilidad vascular); distonina; 4 similar a insulina (placenta); transcobalamina IX; anemia macrocítica; ligando 1 de la quimiocina (motivo C-C); proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, subunidad lábil al ácido; factor H del complemento; beta-1-glucoproteína 6 específica del embarazo; homólogo de plata (ratón); proteoglicano 4; factor 16 de crecimiento de fibroblastos; proteína C17 similar a la citocina; granulinsina; angiopoyetina 2; cromagranina B (secretogranina 1); dominio Sema, dominio de inmunoglobulina (Ig) y ancla de la membrana GPI, (semaforina) 7A; pleiotrofina (factor 8 de crecimiento de unión a la heparina); factor 1 promotor del crecimiento de axones; canal de cloruro, activado por calcio, miembro 3 de la familia; secretoglobina, familia 1D, miembro 1; fibulina 1; receptor 1 de fosfolipasa A2, 180 kDa) y la matriz extracelular (1 similar a ADAMTS; periostina, factor específico de osteoblastos; glipicano 5; repetición rica en leucina neuronal 3; transglutaminasa 2 (polipéptido C, proteína-glutamina-gamma-glutamyltransferasa); similar a desintegrina y metaloproteasa (tipo reprotisina) con motivo tipo 1 de trombospondina, 2; proteína 4 asociada a las microfibrillas; glipicano 3; colágeno, tipo V, alfa 3; inhibidor tisular de metaloproteasa 2; queratocano, proteína oligomérica de la matriz de cartílago; lumicano; proteína 3 de unión a hialuronano y proteoglicano; estatetina; similar a desintegrina y metaloproteasa (tipo reprotisina) con motivo tipo 1 de trombospondina, 3; espondina 1, proteína de la matriz extracelular; 1 similar a quitinasa 3 (glucoproteína 39 del cartílago); colágeno, tipo IV, alfa 3 (antígeno de Goodpasture); familia del sitio de integración de MMTV tipo Wingless, miembro 7B; colágeno, tipo VI, alfa 2; lipocalina 7; proteína 4 de unión a hialuronano y proteoglicano; similar a desintegrina y metaloproteasa (tipo reprotisina) con el motivo tipo 1 de trombospondina, 5 (agrecanasa 2); fibronectina 1; matrilina 1, proteína de la matriz del cartílago; proteína hipotética FLJ3710; beta-1,4-N-acetilgalactosaminiltransferasa de condroitina; metaloproteinasas 16 de matriz (insertada en la membrana); factor de Von Willebrand; colágeno, tipo VI, alfa 2; proteasa transmembrana, serina 6; metaloproteinasas de la matriz 23B; metaloproteinasas de la matriz 14 (insertada en la membrana); repetición rica en leucina neuronal 3; 1 similar a SPARC (mast9, hevina); Sparc/osteonectina, proteoglicano de los dominios similares a cwc y kazal (testicano) 3; dermatopontina; colágeno, tipo XIV, alfa 1 (undulina); amelogenina, ligada a Y; nidogen (enactina); 2 similar a ADAMTS; proteína 2 de unión a hialuronano y proteoglicano; colágeno, tipo XV, alfa 1; glipicano 6; metaloproteinasas de la matriz 12 (elastasa de macrófagos); amelogenina (amelogénesis imperfecta 1, ligada a X); similar a la desintegrina y metaloproteasa (tipo reprotisina) con el motivo tipo 1 de la trombospondina, 15; proteasa transmembrana, serina 6; similar a desintegrina y metaloproteasa (tipo reprotisina) con el motivo tipo 1 de la trombospondina, 16; Sparc/osteonectina, proteoglicano de los dominios similares a cwc y kazal (testicano); similar a la desintegrina y metaloproteasa (tipo reprotisina) con el motivo tipo 1 de trombospondina, 20; colágeno, tipo XI, alfa 1; proteína de unión a hialuronano y proteoglicano; beta-1,4-N-acetilgalactosaminiltransferasa de condroitina; asporina (LRR clase 1); colágeno, tipo III, alfa 1 (tipo IV del síndrome de Ehlers-Danlos, dominante autonómico); fosfoproteína 1 secretada (osteopontina, sialoproteína ósea 1, activación 1 temprana de linfocitos T); proteína Gla de la matriz; fibulina 5; colágeno, tipo XIV, alfa 1 (undulina); inhibidor tisular de la metaloproteinasas 3 (distrofia del fondo de Sorsby, pseudoinflamatorio); colágeno, tipo XXV, alfa 1; proteína oligomérica de la matriz de cartílago; colágeno, tipo VI, alfa 1; condroadherina; colágeno, tipo XV, alfa 1; similar a desintegrina y metaloproteasa (tipo reprotisina) con el motivo tipo 1 de trombospondina, 16; colágeno, tipo IV, alfa 4; fosfoproteína ácida de la matriz de la dentina; colágeno, tipo IV, alfa 1; 1 que contiene repetición de trombospondina; metaloproteinasas de la matriz 16 (insertada en la membrana); colágeno, tipo 1, alfa 2; fibulina 1; tectorina beta; Fosfolipasa D1 específica de glucosilfosfatidilinositol; regulada por incremento en el gen 1 de cáncer colorrectal). Citoesqueleto: (Filamina B, beta (proteína 278 de unión a actina); centrina, proteína de la mano EF, 1; 3 que contiene dominio FERM; integrador 3 de la formación de puente; parvina, gamma; factor de intercambio del nucleótido guanina de Rho (GEF) 11; tirosina cinasa 2; 4 similar a Kelch (*Drosophila*); espectrina, beta, eritrocítica (incluye esferocitosis, tipo 1 clínico); proteína ArgBP2 de interacción con Arg/Abi; advillina; que contiene repetición de espectrina, envoltura nuclear 1; catenina (proteína asociada a la cadherina), delta 1; 5 similar a la banda 4.1 de la proteína de la

membrana de eritrocitos; catenina (proteína asociada a cadherina), alfa 2; ligando 3 de la quimiocina (motivo C-C); sarcoglicano, gamma (glucoproteína asociada a la distrofina de 35 kDa); nebulina; timosina, beta, identificada en células de neuroblastoma; proteína cinasa 1 dependiente de 3-fosfoinositida; proteína de interacción con la proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich, distonina; proteína 1 de interacción con huntingtina; producto del gen KIAA0316; tropomodulina 4 (músculo); suprimida en el cáncer hepático 1; similar a villina; sintrofina, beta 1 (proteína A1 asociada a la distrofina, 59 kDa, componente básico 1); proteína cinasa, dependiente de cGMP, tipo I; Homo sapiens similar a queratina 8; citoqueratina 8; queratina, tipo II citoesquelético 8 (LOC345751), ARNm; aducina 1 (alfa); sustrato de proteína cinasa C y caseína cinasa en neuronas 3; distonina; grupo sanguíneo Kell; proteína 1 de interacción con filamina A; 2 específica de la detención del crecimiento; marco 1 de lectura abierta del cromosoma 1; 2 similar a estatmina; espectrina, alfa, eritrocítica 1 (eliptocitosis 2); gen FKSG44; miembro 1C de la familia de la cinesina; tensina; kaptina (proteína de unión a actina); neurofibromina 2 (neuroma acústico bilateral); homología de plestrina; Sec7 y dominios 2 de superenrollamiento (citohesina 2); proteína T1 relacionada con la actina; similar al síndrome de Wiskott-Aldrich; 4 similar a Kelch (*Drosophila*); homólogo 1 de fascina, proteína de agrupamiento de actina (*Strongylocentrotus purpuratus*); anifisina (síndrome de la persona rígida con el autoantígeno del cáncer de mama de 128 kDa); 1 similar a la enfermedad 2 del riñón poliquístico; anquirina 2, neuronal; proteína cinasa alfa de unión a CDC42 (similar a DMPK); proteína hipotética FLJ36144; proteína ArgBP2 de interacción con Arg/Abl; 3 similar a formina; catenina (proteína asociada a la cadherina), beta 1, 88 kDa; profilina 2; similar a la sinaptopodina 2; sintrofina, gamma 2; fosfolipasa D2; engullición y motilidad celular 2 (homólogo de ced-12, *C. elegans*); neurofilamento, polipéptido ligero de 68 kDa; distonina; 7B similar a actina; miembro 1C de la familia de cinesina; dominio 3 de PDZ y LIM; aducina 2 (beta); obscurina, calmodulina citoesquelética y RhoGEF de interacción con titina; tubulina, parólogo del polipéptido beta; proteína 1 de interacción con filamina A; talina 1; Homo sapiens similar a [Segmento 1 de 2] proteína Piccolo (aczonina) (LOC375597); proteína efectora CDC42 (unión a la GTPasa Rho) 4; sindecano 1; filamina A, alfa (proteína 280 de unión a actina); profilina 2; fosfatasa que contiene dominio C1 similar a la tensina; proteína hipotética MGC33407; GTPasa 1 de la familia Rho; flavoproteína-oxidoreductasa MICAL2; activador de la secreción dependiente de Ca^{2+} ; similar a rabfilina 3A (sin dominios C2); miosina XVA; proteína cinasa, dependiente de cGMP, tipo 1; proteína de interacción con la cadena ligera reguladora de miosina; 13B miembro de la familia de cinesina; homólogo del oncogen RAS muscular; espectrina, beta, no eritrocítica 1; TAO cinasa 2; filamina B, beta (proteína 278 de unión a actina); neurofibromina 2 (neuroma acústico bilateral); catenina (proteína asociada a la cadherina), alfa 3; obscurina, calmodulina citoesquelética y RhoGEF de interacción con titina; coronina, proteína de unión a actina, 1A; 1 similar a la banda 4.1 de la proteína de la membrana de eritrocitos; espectrina, beta, no eritrocítica 4; timosina, beta 4, ligada a Y; tectina 2 (testicular); familia de genes homólogos a Ras, miembro J, serina/treonina cinasa con dominios de homología a Dbl y plestrina; distobrevina, beta; actina, gamma 2, músculo liso, entérica; proteína similar a Tara; caspasa 8, cisteína proteasa relacionada con la apoptosis; 10 que contiene dominio de repetición Kelch y BTB (POZ); mucina 1, transmembrana; proteína tau asociada a los microtúbulos; tensina; familia de genes homólogos a Ras, miembro F (en filopodios); aducina 1 (alfa); actinina, alfa 4; banda 4.1 de la proteína de la membrana de eritrocitos (eliptocitosis 1, ligado a RH); homólogo 2 de bicaudal D (*Drosophila*); anquirina 3, nodo de Ranvier (anquirina G); miosina VIIA (síndrome 1B de Usher (autosómico recesivo, severo)); catenina (proteína asociada a la cadherina), alfa 2; Homo sapiens similar a la queratina 8, tipo II citoesquelética-humana (LOC285233); homólogo 3 de fascina, proteína de agrupamiento de actina, testicular; familia de genes homólogos de Ras, miembro J; proteína 2 estructural de filamento en esferas, facinina; desmina; miosina X; gen 1 asociado a la proliferación inducida por señales; escinderina; 1 similar a la coactosina (*Dictyostelium*); engullición y motilidad celular 2 (homólogo de ced-12, *C. elegans*); tubulina, beta 4; activador de la secreción dependiente de Ca^{2+} ; 4A que contiene dominio FERM; actina, alfa 1, músculo esquelético; talina 1; caldesmona 1; proteína 1 LIM de unión a filamina; proteína tau asociada a los microtúbulos; sintrofina, alfa 1 (proteína A1 asociada a distrofina, 59 kDa, componente ácido); aducina 2 (beta); proteína 1 de interacción con filamina A; dominio 3 de PDZ y de LIM; banda 4.1 similar a 4B de la proteína de la membrana de eritrocitos; proteína de unión a FYN (FYB-120/130); integrador 3 de formación de puente). Extracelular: (similar a desintegrina y metaloproteasa (tipo repolisina) con el motivo tipo 1 de la trombospondina, 20; 1 similar a SPARC (mast9, hevína); inhibidor de serina (o cisteína) proteinasa, clado G (inhibidor de C1), miembro 1 (angioedema, hereditario); urocortina; similar a quimotripsina; polipéptido del factor beta de crecimiento derivado de plaquetas (homólogo al oncogén viral del sarcoma de simio (v-sis)); proteína precursora del regulador endotelial de unión a BMP; factor H del complemento; 1 similar a la hormona somatomamotropina coriónica; ligando 18 de la quimiocina (motivo C-C) (pulmonar y regulada por activación); fibronectina 1; beta-1-glucoproteína 3 específica del embarazo; similar a desintegrina y metaloproteasa (tipo repolisina) con el motivo tipo 1 de la trombospondina, 3; CocoaCrisp; 4 similar a insulina (placenta); familia del sitio de integración MMTV tipo Wingless, miembro 11; proteína oligomérica de la matriz de cartílago; proteasa transmembrana, serina 6; factor de crecimiento inducido por C-fos (factor D de crecimiento endotelial vascular); familia con similitud secuencial 12, miembro B (epididimal); proteína fosfatasa 1, subunidad 9B reguladora, espinofilina; transcobalamina II; anemia macrocítica; factor V de la coagulación (proacelerina, factor lábil); fosfolipasa A2, grupo IID; factor de necrosis tumoral, proteína 6 inducida por alfa; colágeno, tipo XV, alfa 1; proteína 3 de unión a hialuronano y proteoglicano; colágeno, tipo XIV, alfa 1 (undulina); interleucina 19; inhibidor 15 de proteasa; receptor colinérgico, nicotínico, polipéptido 1 beta (muscular); 3 similar a la lisil-oxidasa; proteína 5 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina; hormona 1 del crecimiento; caseína beta; 2 similar a NEL (pollo); factor I (complemento); ligando 23 de la quimiocina (motivo C-C); interferón, alfa 2; metaloproteinasa de la matriz 16 (insertada en la membrana); metaloproteinasa de la matriz 12 (elastasa de macrófagos); glicoproteína 5; beta-1-glucoproteína 3 específica del embarazo; factor 6 de crecimiento de

fibroblastos; homólogo de gremlina 1; superfamilia de nudo de cisteína (*Xenopus laevis*); proteína S (alfa); beta-1,4-N-acetilgalactosaminiltransferasa de condroitina; fosfolipasa D1 específica del glucosilfosfatidilinositol; factor 1 de crecimiento de fibroblastos (ácido); espondina 1, proteína de la matriz extracelular; proteína 1 morfogenética ósea; tensioactivo, proteína B asociada al pulmón; fosfoproteína ácida de la matriz de dentina; lipoproteína, Lp(a); mucina 1, transmembrana; serina proteasa 1 de lectina de unión al manano (componente de activación de C4/C2 del factor reactivo Ra); meprina A, beta; secretoglobina, familia 1D, miembro 1; asporina (LRR clase 1); ligando 25 de la quimiocina (motivo C-C); proteína C17 similar a la citocina; 5 similar a insulina; meprina A, alfa (péptido hidrolasa de PABA); proteína 1 que responde a Scrapie; factor 18 de crecimiento de fibroblastos; ligando 9 de la quimiocina (motivo C-X-C); inhibina, beta B (polipéptido beta de activina AB); factor 8 de crecimiento de fibroblastos (inducido por andrógeno); granulinsina; transcrito regulado por cocaína y anfetamina; colágeno, tipo 1, alfa 2; ligando 17 de la quimiocina (motivo C-C); ligando 23 de la quimiocina (motivo C-C); Sparc/osteonectina, proteoglicano de dominios similares a cwcv y a kazal (testicano) 3; receptor A del ácido gamma-aminobutírico (GABA); defensina, alfa 4, corticostatina; repetición rica en leucina neuronal 3; glipicano 6; proteína cinasa cinasa 2 activada por mitógeno; factor de coagulación XI (antecedente de la tromboplastina plasmática); ligando 5 de la quimiocina (motivo C-C); distonina; proteína relacionada con frizzled; factor XIII de la coagulación, polipéptido A1; factor 1 de crecimiento similar a la insulina (somatomedina C); proteína hipotética MGC45438; antígeno 11 asociado al semen; factor 1 de crecimiento similar a la insulina (somatomedina C); periostina, factor específico de osteoblastos; alfa-2-macroglobulina, receptor A del ácido gamma-aminobutírico (GABA), alfa 5; inhibidor de serina (o cisteína) proteinasa, clado A (antiproteína alfa-1, antitripsina), miembro 3; homólogo de plata (ratón); proteína relacionada con frizzled; condroadherina; beta-1,4-N-acetilgalactosaminiltransferasa de condroitina; receptor 3 de 5- hidroxitriptamina (serotonina), miembro C de la familia; colágeno, tipo VI, alfa 2; receptor 9 similar a Toll; amelogenina, ligada a Y; factor B de crecimiento endotelial vascular; 1 similar a Spokehead radial; tirosina cinasa 1 relacionada con Fms (receptor del factor de crecimiento endotelial vascular/factor de permeabilidad vascular); inhibidor 16 de proteasa; interleucina 2; clusterina (inhibidor de la lisis del complemento, SP-40,40, glucoproteína 2 sulfatada, mensajero 2 de la próstata reprimido por testosterona, apolipoproteína J); hormona estimulante del folículo, polipéptido beta; similar a la desintegrina y metaloproteasa (tipo repolisina) con el motivo tipo 1 de trombospondina, 16; lisozima (amiloidosis renal); homólogo del borde radical (*Drosophila*); proteína 5 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina; taxilina; apolipoproteína A-V; factor C de crecimiento derivado de plaquetas; 1 similar al ligando 3 de la quimiocina (motivo C-C); factor 16 de crecimiento de fibroblastos; colágeno, tipo VI, alfa 2; inhibidor de la serina (o cisteína) proteinasa, clado C (antitrombina), miembro 1; ligando 11 de la quimiocina (motivo C-C); colágeno, tipo IV, alfa 4; tirosina cinasa de agammaglobulinemia de Bruton; factor 2 de crecimiento similar a la insulina (somatomedina A); dominio 1 del inhibidor de serina proteasa tipo Kazal; fibrinógeno, polipéptido alfa; ligando 1 de la quimiocina (motivo C-C); inhibina, beta E; globulina de unión a hormona sexual; colágeno, tipo IV, alfa 1; lecitina-colesterol aciltransferasa; proteína 2 secretora rica en cisteína; proteína 1 de unión a hialuronano y proteoglicano; precursor C del péptido natriurético; ribonucleasa; familia de RNasa A, k6; factor 14 de crecimiento de fibroblastos; 2 similar a ADAMTS; colágeno, tipo IV, alfa 3 (antígeno de Goodpasture); angiopoietina 2; apolipoproteína L, 3; ligando 12 quimiocina (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células del estroma); proteína 2 de unión a hialuronano; factor VII de coagulación (acelerador de la conversión de protrombina sérica); colágeno, tipo XIV, alfa 1 (undulina); glucoproteína oviductal 1, 120 kDa (mucina 9, oviductina); matrilina 1, proteína de la matriz de cartilago; mucina 5, subtipos A y C, traqueobronquial/gástrica; superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 11b (osteoprotegerina); transglutaminasa 2 (polipéptido C, proteína-glutamina-gamma-glutamyltransferasa); queratocano; colágeno, tipo V, alfa 3; dominio 2 del núcleo de cuatro disulfuros de WAP; ligando 1 de la quimiocina (motivo C-X3-C); inhibidor de serina (o cisteína) proteinasa, clado D (cofactor de heparina), miembro 1; proteína secretora LOC348174; factor X de la coagulación; interleucina 16 (factor quimioatrayente de linfocitos); proteína 2 relacionada con la lipasa pancreática; serina peptidasa 3 de HtrA; receptor de glicina, alfa 3; similar al antígeno CD5 (familia rica en cisteína del receptor depurador); proteína hipotética MGC39497; factor VIII de coagulación, componente procoagulante (hemofilia A); dermatopontina; nogina; 1 que contiene dominio LY6/PLAUR secretado; 1 similar a ADAMTS; glucoproteína alfa-1-B; marco de lectura abierta 175 del cromosoma 20; familia del sitio de integración de MMTV tipo Wingless; miembro 8B; fibulina 1; fibulina 5; catepsina S; Nidogen (enactina); ligando 26 de la quimiocina (motivo C-C); molécula 1 específica de células endoteliales; 1 similar a la quitinasa 3 (glucoproteína 39 de cartilago); receptor A del ácido gamma-aminobutírico (GABA) A, beta 1; secretoglobina, familia 1D, miembro 2; serina proteasa 1 de lectina de unión a manano (componente de activación de C4/C2 del factor reactivo Ra); 1 similar a ADAMTS; dominio Sema, dominio de inmunoglobulina (Ig) y ancla de la membrana de GP1, (semaforina) 7A; similar a desintegrina y metaloproteasa (tipo repolisina) con el motivo tipo 1 de la trombospondina, 15; preproteína subtilisina/quexina de convertasa tipo 2; factor 1 de crecimiento similar a la insulina (somatomedina C); retinosquisis (juvenil ligado a X) 1; similar a desintegrina y metaloproteasa (tipo repolisina) con el motivo tipo 1 de trombospondina, 16; ligando 2 de quimiocina (porción C); factor 5 de crecimiento de fibroblastos; antígeno 11 asociado al esperma; proteína 4 asociada a las microfibrillas; receptor del virus de la poliomielititis, cinasa 8 regulada por la señal extracelular; proteasa transmembrana, serina 6; proteína cinasa C, alfa; 2 similar a la quitinasa 3; interleucina 9; apolipoproteína L, 6; tensioactivo, proteína A1 asociada al pulmón; colágeno, tipo VI, alfa 1; apolipoproteína L, 6; proteína hipotética FLJ13710; carboxipeptidasa B2 (plasma, carboxipeptidasa U); 2 similar a la proteína bactericida/de incremento de la permeabilidad; factor 5 de crecimiento de fibroblastos; fosfoproteína 1 secretada (osteopontina, sialoproteína ósea I, activación 1 temprana de linfocitos T); serina peptidasa 3 de HtrA; suprimido en cáncer hepático 1/ molécula 1 específica de células endoteliales; factor de Von Willebrand; similar a desintegrina y metaloproteasa (tipo repolisina) con motivo tipo 1 de

trombospondina, 5 (agrecanasa-2); dominio Sema, dominio de inmunoglobulina (Ig), dominio básico corto, secretado, (semaforina) 3A; ligando 12 de la quimiocina (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células del estroma); estaterina; cinasa 8 regulada por la señal extracelular; inhibidor tisular de metaloproteínasa 3 (distrofia del fondo de Sorsby, pseudoinflamatoria); factor 4 de plaquetas (ligando 4 de la quimiocina (motivo C-X-C)); tensioactivo, proteína D asociada al pulmón; factor H del complemento; homólogo 1 similar a Delta (*Drosophila*); dominio 1 del núcleo de cuatro disulfuros de WAP; proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina; subunidad lábil al ácido; cáncer de mama 2, aparición temprana; gen 1 de linfocitos pre-B; hormona de liberación de corticotropina; proteína hipotética DKFZp434B044; proteína inducida por prolactina; proteína 4 de liberación de RAS-guanilo; progastriksina (pepsinógeno C); dominio Sema, dominio de inmunoglobulina (Ig), dominio básico corto, secretado, (semaforina) 3F; regulado por incremento en el gen 1 de cáncer colorrectal; proteoglicano 4; receptor colinérgico, nicotínico, polipéptido delta; proteína oligomérica de la matriz de cartílago; grupo sanguíneo ABO (transferasa A, alfa-1-3-N-acetilgalactosaminiltransferasa; transferasa B, alfa-1-3-galactosiltransferasa); interleucina 12A (factor 1 estimulante de células asesinas naturales, factor 1 de maduración de linfocitos citotóxicos, p35); factor 7 de crecimiento del fibroblastos (factor de crecimiento de queratinocitos); Kin de 3 similar a IRRE (*Drosophila*); receptor colinérgico, nicotínico, polipéptido alfa 2 (neuronal); asociado al carcinoma del epitelio del paladar, del pulmón y nasal; colágeno, tipo XV, alfa 1; pleiotrofina (factor 8 de crecimiento de unión a la heparina, factor 1 promotor del crecimiento de neuronas); 2 similar a la angiopoietina; enfermedad de Norrie (pseudoglioma); ligando 3 de la quimiocina (motivo C-C); 1 similar a la quitinasa 3 (glucoproteína 39 de cartílago); inhibidor H3 de inter-alfa (globulina); amelogenina (amelogénesis imperfecta 1, ligada a X); factor de crecimiento epidérmico (beta-urogastrona); factor 13 de crecimiento de fibroblastos; familia del sitio de integración de MMTV tipo Wingless, miembro 7B; receptor colinérgico, nicotínico, polipéptido gamma; beta-1-glucoproteína 6 específica del embarazo; metaloproteínasa 14 de la matriz (insertada en la membrana); ligando 26 de la quimiocina (motivo C-C); interferón, alfa 6; taquicinina, precursor 1 (sustancia K, sustancia P, neurocinina 1, neurocinina 2, neuromedina L, neurocinina alfa, neuropéptido K, neuropéptido gamma); proteína 5 secretada relacionada con frizzled; proteína 4 de unión a hialuronano y proteoglicano; componente 4B del complemento; metaloproteínasa 16 de matriz (insertada en la membrana); factor 7 de crecimiento de fibroblastos (factor de crecimiento de queratinocitos); apolipoproteína C-II; canal de cloruro, activado por calcio, miembro 3 de la familia; tetranectina (proteína de unión al plasminógeno); colágeno, tipo III, alfa 1 (síndrome de Ehlers-Danlos tipo IV, dominante autosómico); proteína KIAA0556; ligando 4 de la quimiocina (motivo C-C); hemopexina; inhibidor H1 de inter-alfa (globulina); relaxina 1; proteína Gla de matriz; similar a desintegrina y metaloproteasa (tipo repolisina) con el motivo tipo 1 de trombospondina, 2; receptor 2 del interferón (alfa, beta y omega); fosfatasa ácida, próstata; proteína de unión al nucleótido guanina (proteína G), gamma 8; metaloproteínasa 23B de la matriz; meprina A, alfa (péptido hidrolasa de PABA); hialuronoglucosaminidasa 1; angiotensinógeno (inhibidor de la serina (o cisteína) proteinasa, clado A (antiproteínasa alfa-1, antitripsina), miembro 8); proteína de la capa intermedia de cartílago, pirofosfohidrolasa nucleotídica; receptor purinérgico P2X, canal de iones dependiente de ligando, 7; glipicano 3; tectorina beta; interferón, alfa 5/ lipocalina 7; variante 1 del factor 4 de plaquetas; nucleobindina 1; colágeno, tipo XI, alfa 1; polipéptido inhibidor gástrico; 1 que contiene repetición de trombospondina; miembro D de la familia del receptor 3 de 5-hidroxitriptamina (serotonina); colágeno, tipo XXV, alfa 1; factor 9 de diferenciación del crecimiento; proteína hipotética DKFZp434B044; endotelina 3; ligando 2 de la quimiocina (motivo C); procinetina 2; superfamilia del receptor de factor de necrosis tumoral, miembro 11b (osteoprotegerina); inhibidor tisular de la metaloproteínasa 2; distonina; cromogranina B (secretogranina 1); proteína 2 de unión a hialuronano y proteoglicano; repetición rica en leucina neuronal 3; lumican; matrilina 1, proteína de la matriz de cartílago; fosfolipasa A2, grupo IIA (plaquetas, líquido sinovial); carboxilesterasa 1 (serina esterasa 1 de monocitos/macrófagos); Sparc/osteonectina, proteoglicano de los dominios similares a cwc y kazal (testicano); homólogo 2 de Dickkopf (*Xenopus laevis*); receptor del ácido gamma-aminobutírico (**GABA**) A, alfa 3; beta-1-glucoproteína 11 específica del embarazo; proteína 1 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina; defensina, beta 106; interleucina 17F; subunidad de los canales de iones dependientes de ligando; receptor 1 de fosfolipasa A2, 180 kDa; factor 1 (complemento); distonina; homólogo 1 de aseguramiento de la longevidad de LAG1 (*S. cerevisiae*); prolactina; secuencia 264 expresada por testículos, dominio SEMA, dominio de inmunoglobulina (Ig), dominio básico corto, secretado, (semaforina) 3D; proteína 2 secretada relacionada con frizzled; proteína 4 secretada relacionada con frizzled.

Existen grupos de genes presentes únicamente en UCEC. Estos genes están relacionados con los siguientes:

Homeostasis (albúmina; receptor detector de calcio; acuaporina 9; lactotransferrina. Morfogénesis: Homeocaja HB9; antígeno 1 similar al epitelial V). Desarrollo embrionario (Relaxina 2; molécula 8 de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario; indolamina-pirrol-2,3-dioxigenasa; receptor A3 de EPH; factor embrionario tirotrófico; beta-1-glucoproteína 1 específica del embarazo; laminina, alfa 3), el espacio extracelular (tensioactivo, proteína A1 asociada al pulmón; beta-1-glucoproteína 1 específica del embarazo; lactotransferrina; TGF-alfa; albúmina; FGF-alfa; proteína A9 de unión al calcio S100 (calgranulina B)), la matriz extracelular (laminina, beta 4; laminina, alfa 3; glucoproteína 4 de la zona pelúcida. Actividad de moléculas estructurales: marco de lectura abierta 29 del cromosoma 21; laminina, alfa 3; proteína 2 asociada a los microtúbulos; laminina, beta 4; queratina 6B; laminina 1; queratina 6A; ocludina; loricrina; banda 4.1 de la proteína de la membrana de eritrocitos (eliptocitosis 1, ligada a RH); cristalina, beta A2; proteína estructural del cristalino del ojo; 4 similar a la proteína asociada a contactina; claudina 19; proteína hipotética LOC144501; queratina 6E; queratina 6L; proteína 2 de la membrana intrínseca del cristalino, 19 kDa), el citoesqueleto (proteína 2 asociada a los microtúbulos; 5 similar a la banda 4.1 de la proteína de la membrana de eritrocitos; tricoialina de *Homo sapiens* (THH); queratina 6B;

queratina 6A; antígeno 1 similar a epitelial V; homólogo de Hook 1 (*Drosophila*); loricrina; banda 4.1 de la proteína de la membrana de eritrocitos (eliptocitosis 1, ligada al RH); tropomodulina 1; cinasa 1 de regulación por afinidad de MAP/microtúbulos; queratina 6E; familia de proteínas LIM de unión a actina, miembro 2), moléculas de adhesión celular (cadherina 19, tipo 2; leucemia mieloide/linfoide o de linaje mixto; marco de lectura abierta 29 del cromosoma 21; Kin de 2 similar a IRRE; laminina, alfa 3; sialoadhesina; antígeno CD84 (antígeno leucocitario); lectina, unión al galactósido, soluble, 2 (galectina 2); antígeno 1 similar al epitelial V; antígeno CD96; antígeno de la nefritis tubulointersticial; molécula 8 de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario; IL-18; superfamilia de inmunoglobulina, miembro 1; integrina, beta 8; ornitina arbamoiltransferasa; integrina, beta 6; 4 similar a la proteína asociada a contactina; colágeno, tipo XVII, alfa 1; 26 similar a la cadherina; similar a mucina y cadherina), proteínas de diferenciación celular (proteína tirosina fosfatasa, tipo receptor, polipéptido 1 de Z; laminina, alfa 3; antígeno CD84 (antígeno leucocitario); EDRF2; factor 2 relacionado con la diferenciación eritroide de *Homo sapiens*; similar a p73 de proteína tumoral; proteína relacionada con la apoptosis/diferenciación de NB4; PNAS-133 de *Homo sapiens*; similar a siete en ausencia 2; interleucina 24; queratina 6B; queratina 6A; miembro 9 de la deshidrogenasa/reductasa (familia SDR); proteína de uniones comunicantes, beta 5 (conexina 31.1); proteína 4 de homeocaja de iroquois; homeocaja 2 anterior ventral; ligando 10 de la quimiocina (motivo C-X-C); superfamilia del receptor de factor de necrosis tumoral, miembro 17; canal de calcio, dependiente del voltaje, subunidad beta 2; enfermedad de Parkinson (recesiva autonómica, juvenil) 2, parkina; calicreína 7 (quimotriptica, estrato cómeo); células de la glía que carecen del homólogo 2; AP-2 alfa; proteína tirosina fosfatasa, tipo receptor, polipéptido 1 de Z; troponina T1; esclerina; glucosaminil-(N-acetil)-transferasa 2, enzima de ramificación en I; colágeno, tipo XVII, alfa 1; supresor de la señalización 2 de citocinas; homeocaja 1 distal-menos; detención 1 del cigoto; interleucina 20; factor 3 de diferenciación del crecimiento; FGF-23; familia del sitio de integración de MMTV tipo Wingless, miembro 8A. Extracelular: Marco de lectura abierta 29 del cromosoma 21; laminina, alfa 3; laminina, beta 4; interleucina 24; beta-1-glucoproteína 1 específica del embarazo; ligando 11 de la quimiocina (motivo C-X-C); tensioactivo, proteína A1 asociada al pulmón; prepronociceptina; receptor 3B de 5-hidroxitriptamina (serotonina); molécula 8 de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario; ligando 10 de la quimiocina (motivo C-X-C); IL-18 (factor inductor de interferón-gamma); lactotransferrina; albúmina; ligando Fas (superfamilia de TNF, miembro 6); receptor colinérgico, nicotínico, polipéptido 4 beta; péptido antimicrobiano de catelicidina; proteasa similar a la tripsina de las vías respiratorias; proteína A9 de unión al calcio S100 (calgranulina B); TGF-alfa; calicreína 10; inhibidor de serina proteasa, tipo 1 de Kunitz; proteína 3 de la vía de señalización inducible por WNT1; relaxina 2; interferón, kappa; defensina, beta 103A; IL-20; glucoproteína 4 de la zona pelúcida; factor 3 de diferenciación del crecimiento; FGF-23; familia del sitio de integración de MMTV tipo Wingless, miembro 8A; 5 relacionado con el factor H del complemento), proteínas del desarrollo (receptor A3 de EPH; cinasa 2 relacionada con NIMA (nunca en el gen a en mitosis); proteína 282 de dedo de cinc; cinasa 1 de unión a TANK; homólogo A de la recombinación meiótica 11 de MRE11; factor 2 de transcripción de E2F; proteína tirosina fosfatasa, tipo receptor, polipéptido 1 de Z; ARNm expresado en mama del clon 161455 de *Homo sapiens* del cromosoma X; laminina, alfa 3; 1 similar al homólogo del oncogen viral de la mieloblastosis v-myb (aviar); regulador de la señalización 11 de la proteína G; proteína 2 asociada a microtúbulos; proteína 16A transmembrana; poliposis adenomatosa del colon 2; homeocaja HB9; proteína F del centrómero, 350/400 ka (mitosina); antígeno CD84 (antígeno leucocitario); EDRF2; factor 2 relacionado con la diferenciación eritroide de *Homo sapiens*; similar a la proteína p73 tumoral; proteína relacionada con la apoptosis/diferenciación de NB4; PNAS-133 de *Homo sapiens*; P2 de caja Forkhead; proteína YA61P (YA61) expresada diferencialmente asociada al sistema gástrico de *Homo sapiens*; tenascina N; marco de lectura abierta 49 del cromosoma 6; proteína 462 de dedo de cinc; proteína 71 de dedo de cinc (Cos26); caja 7 de SRY (región determinante del sexo Y); receptor de disparo expresado sobre 4 similar a las células mieloides; interleucina 24; beta-1-glucoproteína 1 específica del embarazo; proteoglicano 5 de sulfato de condroitina (neuroglicano C); queratina 6B; queratina 6A; miembro 9 de deshidrogenasa/reductasa (familia SDR); antígeno 1 similar al epitelial V; proteína de uniones comunicantes, beta 5 (conexina 31.1); receptor 51 acoplado a la proteína G; factor 6 regulador del interferón; neurotrofina 5 (neurotrofina 4/5); antígeno CD96; proteína 4 de la homeocaja iroquois; 1 similar al receptor de interleucina 1; 1 expresado en fase G-2 y S; subfamilia 2 del receptor nuclear, grupo E, miembro 3; homeocaja 2 anterior ventral; proteína 215 de dedo de cinc; segmento de ADN sobre la secuencia expresada por 234 del cromosoma 4 (único); molécula 8 de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario; ligando 10 de la quimiocina (motivo C-X-C); IL-18; indolamina-pirrol-2,3-dioxigenasa; albúmina; receptor detector de calcio (hipercalcemia hipocalciúrica 1, hiperparatiroidismo neonatal severo); ligando Fas (superfamilia de TNF, miembro 6); superfamilia de TNFR, miembro 17; canal de calcio, dependiente del voltaje, subunidad beta 2; enfermedad de Parkinson (recesiva autonómica, juvenil) 2, parquin; calicreína 7 (quimotriptica, estrato cómeo); células de la glía que carecen del homólogo 2; TGF-alfa; factor embrionario tirotrófico; AP-2 alfa (proteína 2 alfa de unión al potenciador de la activación); calicreína 10; regulador de la señalización 7 de proteína G; proteína tirosina fosfatasa, tipo receptor, polipéptido 1 de Z; inhibidor de la serina proteasa, tipo 1 de Kunitz; proteína 3 de la vía de señalización inducible por WNT1; miembro 3 heterotáxico 1 de la familia Zic (homólogo apareado impar, *Drosophila*); proteína cinasa TTK; troponina T1, esquelética, lenta; esclerina; similar al factor 2 inducido por TGFB, ligado a X; calicreína 8 (neuropsina/ovasina); glucosaminil-(N-acetil)-transferasa 2, enzima de ramificación I; dominio 30A de repetición de anquirina; relaxina 2; colágeno, tipo XVII, alfa 1; gen diferencialmente expresado en próstata; regulador 3 de fosfatasa y actina; supresor de la señalización 2 de citocinas; subfamilia 4 del receptor nuclear, grupo A, miembro 3; enzima convertidora de angiotensina I (peptidil-dipeptidasa A) 1; proteína hipotética MGC17986; homeocaja 1 Distal-less; homólogo 3 de aseguramiento de la longevidad LAG1 (*S. cerevisiae*); detención 1 de cigoto; interferón; kappa; IL-20; inhibidor de la caspasa-1 de ICEBERG; factor 3 de diferenciación del crecimiento;

FGF-23; secuencia 15 expresada por testículos; familia del sitio de integración MMTV tipo Wingless, miembro 8A; caja 7 de SRY (región determinante del sexo Y); asociada a la deficiencia de carnitina, expresada en el ventrículo 1; procinectina 1; 3 similar a la proteína 3 de enlace al elemento que responde a CAMP; familia del dominio de reclutamiento de caspasa, miembro 15; proteína FLJ23311).

5 **Ejemplo 6: Diferenciación directa de células madre epiteliales del cordón umbilical (UCEC) en queratinocitos epidérmicos de la piel**

Para la diferenciación en queratinocitos epidérmicos de la piel, las células madre epiteliales del cordón umbilical, células UCEC, se cultivaron según un protocolo estándar para el cultivo de queratinocitos. Las técnicas de aislamiento celular fueron como se han descrito anteriormente. A continuación, las UCEC se cultivaron en medio de crecimiento de queratinocitos libre de suero, KGM, KGM-2 (Cambrex), EpiLife (Cascade Biologicals) o en medio de Green en presencia de una capa alimentadora embrionaria de ratón 3T3 irradiada o tratada con mitomicina C a 37 °C, 5 % de CO₂. La morfología de las células UCEC así diferenciadas se asemejó a los queratinocitos epidérmicos humanos. Las células epiteliales tienen morfología similar al microscopio óptico y pueden convertirse fácilmente en fibroblastos usando medios convencionales y comercialmente disponibles (véase la Figura 2).

El análisis inmunofluorescente muestra que las UCEC cultivadas también expresan marcadores moleculares de queratinocitos epidérmicos tales como queratinas, desmosoma, hemidesmosoma y componentes de la membrana basal (véase también la Fig. 10 que muestra que las UCEC son calificadas para ser células epiteliales en general por la expresión de una variedad de marcadores de células epiteliales). En consecuencia, estos resultados muestran que las células progenitoras/madre epiteliales del cordón umbilical de la presente invención pueden diferenciarse en células de la piel tales como queratinocitos epidérmicos que pueden usarse para la curación de heridas y tienen mayor potencial para el desarrollo de equivalentes de piel cultivada.

Ejemplo 7: Expansión de células madre epiteliales y mesenquimatosas del cordón umbilical usando explantes tisulares repetitivos de tejidos de la membrana que reviste el cordón umbilical

Se expandieron células madre epiteliales y mesenquimatosas del cordón umbilical de la invención usando explantes repetitivos de tejido de la membrana amniótica del cordón umbilical, como sigue. Brevemente, en el día 1 del proceso, explantes tisulares se sembraron sobre placas de cultivo de tejidos en medios de crecimiento (DMEM/10 % de STF, EpiLife, KGM, KGM-2 o M171) a 37 °C, 5 % de CO₂; los medios se cambiaron cada 2 o 3 días. Comenzaron los crecimientos celulares y continuaron migrando de los explantes durante 7 días. Después de eso, los explantes tisulares se transfirieron a otras placas para permitir el crecimiento posterior de las células. Este procedimiento continuó hasta que los explantes habían disminuido de tamaño, previniendo la posterior explantación. En este contexto se observa que los explantes se encogen progresivamente en tamaño hasta que son demasiado pequeños para el explante tisular posterior, ya que durante el procedimiento de crecimiento y migración de las células de los explantes tisulares, las células producen proteasas para digerir y romper el tejido. La Fig. 16 ilustra esquemáticamente el procedimiento de expansión rápida y robusta de las células madre epiteliales y mesenquimatosas del cordón umbilical logrado usando este protocolo. Así, este estudio demuestra el alto rendimiento de las células UCMC y UMEC que pueden obtenerse a partir de esta fuente, reflejando además la alta viabilidad y las características de pro-crecimiento de estas células en comparación con otras fuentes de células como células madre de médula ósea y derivadas de tejido adiposo. Además, siendo un tejido sólido, la técnica de explante repetitivo exitosa usada en el presente documento demuestra que las células de la invención pueden extraerse uniformemente del tejido completo en vez de únicamente ciertas porciones. Esto permite que pueda derivarse el número máximo de células a un pase bajo en vez de efectuar pases de las células a través de muchas generaciones, provocando el deterioro de las células.

Ejemplo 8: Diferenciación directa de las células mesenquimatosas del cordón umbilical (UCMC) en fibroblastos dérmicos de la piel

Para la diferenciación en fibroblastos dérmicos de la piel, las células madre mesenquimatosas del cordón umbilical, las células UCMC, se cultivaron según un protocolo estándar para el cultivo de fibroblastos. Las técnicas de aislamiento de células fueron como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 6. A continuación, las UCMC se cultivaron en DMEM o medios de crecimiento de fibroblastos comercialmente disponibles (FGM). La morfología de las células UCMC así diferenciadas se asemejó a los fibroblastos dérmicos humanos. Las células mesenquimatosas tienen morfología similar al microscopio óptico y pueden convertirse fácilmente en fibroblastos usando medios convencionales y comercialmente disponibles (véase la Figura 3).

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de aislamiento de células madre/progenitoras epiteliales o mesenquimatosas de la membrana amniótica del cordón umbilical, expresando las células madre/progenitoras epiteliales o mesenquimatosas el gen POU5f1 que codifica el factor de transcripción octámero-4 (Oct-4), comprendiendo el procedimiento:
- 5 (a) separar la membrana amniótica de los otros componentes del cordón umbilical aislado *in vitro*;
- (b) cultivar el tejido de la membrana amniótica obtenido en la etapa (a) en un medio de cultivo en condiciones que permitan la proliferación celular; y
- (c) aislar las células madre/progenitoras epiteliales o mesenquimatosas.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además:
- 10 (a") separar las células madre epiteliales o mesenquimatosas del tejido de la membrana amniótica antes del cultivo por digestión enzimática o explante tisular directo.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que las células madre/progenitoras epiteliales o mesenquimatosas tienen propiedades similares a las células madre embrionarias.
4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además:
- 15 (d) cultivar las células madre/progenitoras epiteliales o mesenquimatosas en un medio de cultivo en condiciones que permiten que las células experimenten expansión clónica.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, que comprende además:
- (e) cultivar las células madre/progenitoras epiteliales o mesenquimatosas en un medio de cultivo en condiciones que permitan la diferenciación de dichas células en células epiteliales y/o células mesenquimatosas; y
- 20 (f) aislar las células diferenciadas.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que las células epiteliales están seleccionadas del grupo que consiste en: células epiteliales de la piel, células foliculares del pelo, células epiteliales de la córnea, células epiteliales de la conjuntiva, células epiteliales de la retina, células epiteliales del hígado, células epiteliales del riñón, células epiteliales pancreáticas, células epiteliales esofágicas, células epiteliales del intestino delgado, células epiteliales del intestino grueso, células epiteliales del pulmón, células epiteliales de las vías respiratorias, células epiteliales de la vejiga y células epiteliales uterinas.
- 25 7. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que las células mesenquimatosas están seleccionadas del grupo que consiste en: fibroblastos de la piel, condrocitos, osteoblastos, tenocitos, fibroblastos de ligamentos, cardiomiocitos, células del músculo liso, células del músculo esquelético, adipocitos, células derivadas de las glándulas endocrinas, células neuroectodérmicas y todas las variedades y derivados de las células neuroectodérmicas.
- 30 8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además:
- (g) preservar las células madre/progenitoras aisladas para el uso posterior.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que la preservación se lleva a cabo usando criopreservación.
10. Una célula madre/progenitora epitelial o mesenquimatosa aislada de la membrana amniótica del cordón umbilical por medio del procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, 8-9.
- 35 11. Un banco de células que comprende una célula madre/progenitora epitelial o mesenquimatosa aislada por medio del procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, 8-9.
12. Una composición farmacéutica que comprende una célula madre/progenitora según se define en la reivindicación 10.
13. La composición farmacéutica de la reivindicación 12, en la que la composición farmacéutica está adaptada para administración sistémica o tópica.
- 40 14. La composición farmacéutica de la reivindicación 12 o 13, en la que la composición farmacéutica adaptada para administración tópica está seleccionada del grupo que consiste en una pomada, una crema y una loción.
15. Una célula madre/progenitora según se define en la reivindicación 10 para tratar un sujeto que tiene un trastorno, en la que el trastorno está seleccionado del grupo que consiste en trastorno tisular, enfermedad neoplásica, enfermedad de la

piel, deficiencia endocrina visceral y un trastorno neural.

16. La célula madre/progenitora de la reivindicación 15, en la que el trastorno tisular es una deficiencia tisular congénita o adquirida.

5 17. La célula madre/progenitora de la reivindicación 15, en la que la deficiencia endocrina visceral está seleccionada del grupo que consiste en deficiencia de insulina, diabetes mellitus asociada a deficiencia de insulina, deficiencia de testosterona, anemia, hipoglucemia, hiperglucemia, deficiencia pancreática, deficiencia suprarrenal y anomalías tiroideas.

18. La célula madre/progenitora de la reivindicación 15, en la que el trastorno neural es enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedades de Lou Gehrig y enfermedad de Huntington.

10 19. La célula madre/progenitora de la reivindicación 15, en la que la enfermedad de la piel es envejecimiento acelerado o una herida.

20. La célula madre/progenitora de la reivindicación 15, en la que la enfermedad neoplásica es cáncer.

15 21. La célula madre/progenitora de la reivindicación 20, en la que el cáncer es uno seleccionado del grupo que consiste en carcinoma de células escamosas, carcinoma ductal y lobular de mama, carcinoma hepatocelular, carcinoma nasofaríngeo, cáncer de pulmón, cáncer de huesos, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de la cabeza o el cuello, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer testicular, cáncer uterino, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de la uretra, cáncer del pene, cáncer de próstata, leucemias crónicas o agudas, tumores sólidos de la infancia, linfoma linfocítico, cáncer de vejiga, cáncer del riñón o del uréter, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, neoplasia del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, glioma del tronco encefálico, adenoma de la pituitaria, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, o cualquier combinación de tales cánceres, incluyendo formas diseminadas (en metástasis) de los mismos.

25 22. El uso de una célula madre/progenitora epitelial o mesenquimatosa de la reivindicación 10 para la producción de una molécula biológica.

23. El uso de la reivindicación 22, en el que la molécula biológica está seleccionada del grupo que consiste en una proteína, un péptido, una molécula orgánica pequeña, un oligosacárido, un polisacárido, un proteoglicano y un lípido.

30 24. El uso de una célula madre/progenitora epitelial o mesenquimatosa según se define en la reivindicación 10 como capa alimentadora en el cultivo de células de mamífero.

25. Un procedimiento *in vitro* de cultivo de células madre/progenitoras epiteliales o mesenquimatosas de la reivindicación 10, que comprende:

obtener un explante tisular de la membrana amniótica aislada del cordón umbilical;

35 cultivar el explante tisular en medios de cultivo y condiciones de cultivo adecuadas durante un periodo de tiempo adecuado.

26. El procedimiento de la reivindicación 25, que comprende además exponer el explante tisular a medios de cultivo recién preparados y continuar el cultivo en condiciones adecuadas durante un periodo de tiempo adecuado.

27. El uso de medios de cultivo de células libres de suero para cultivar células madre mesenquimatosas obtenidas mediante un procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

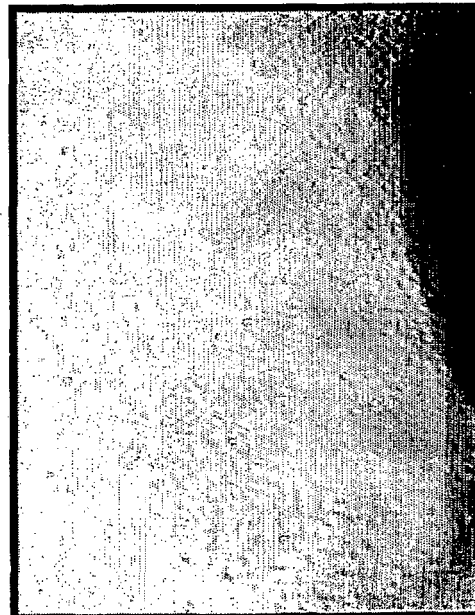
40



A



C



B

FIGURA 1

FIGURA 2

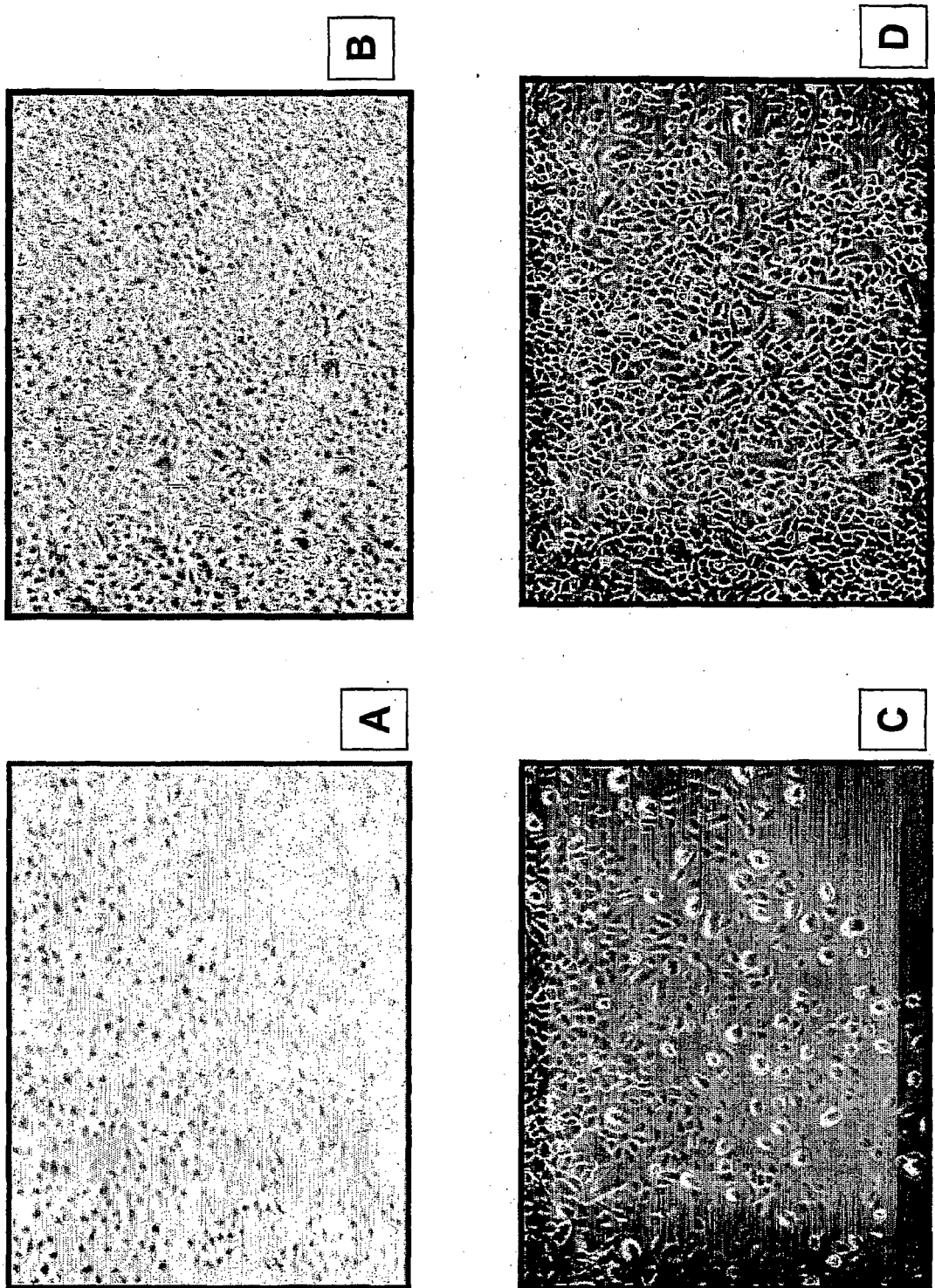
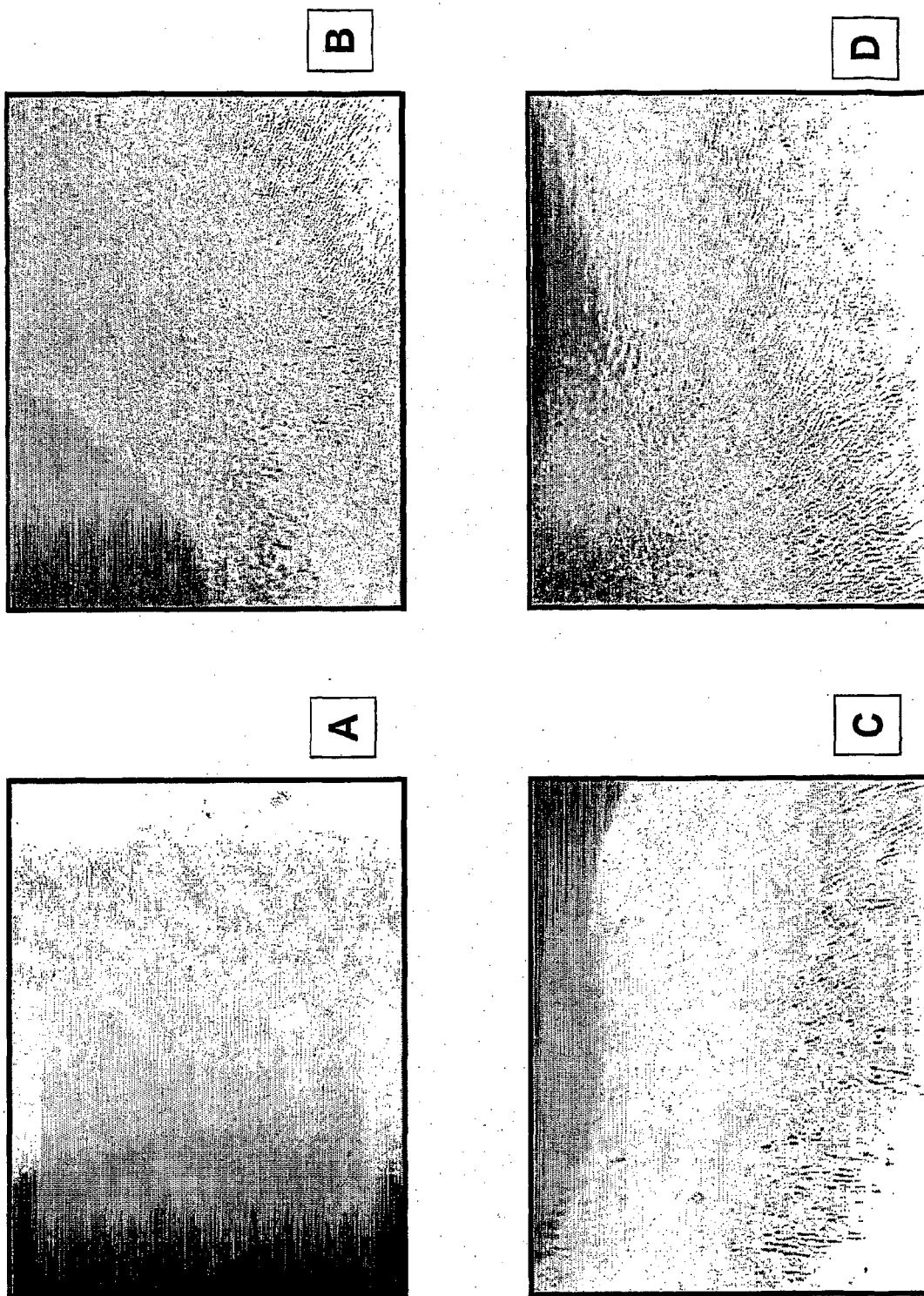
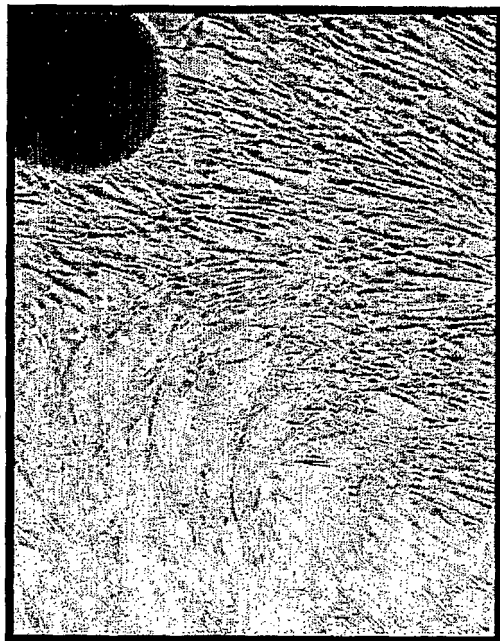


FIGURA 3





B



A

FIGURA 4

Figura 5: Morfología de fibroblastos dérmicos normales (NF) y células mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo (ADMC) o células madre mesenquimatosas del cordón umbilical (UCMC) en medio libre de suero (DMEM) y con suero (DMEM/10 % de STF)

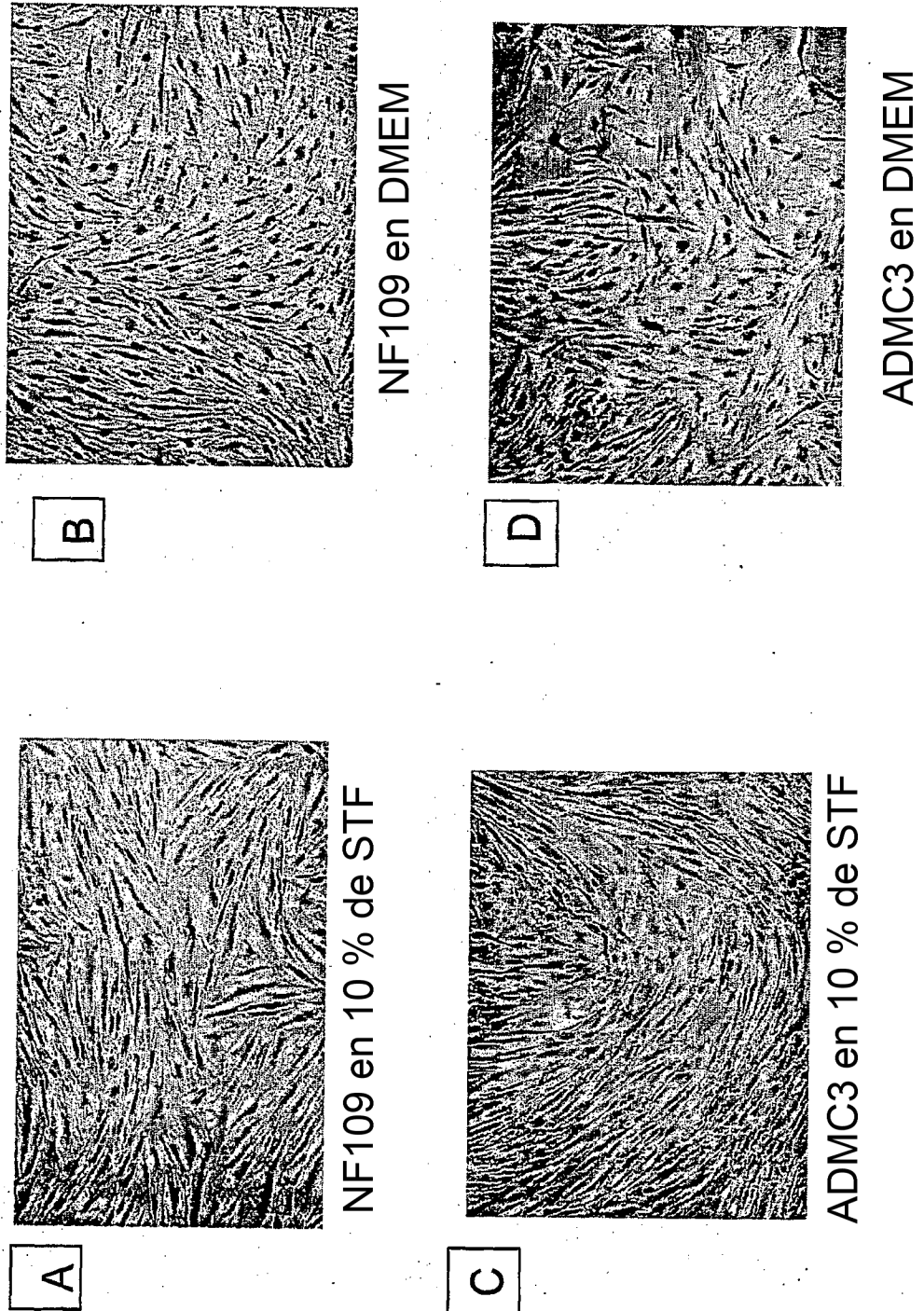


Figura 5: continuación...

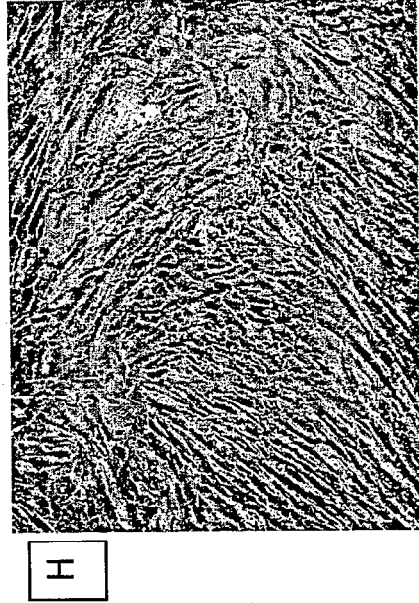
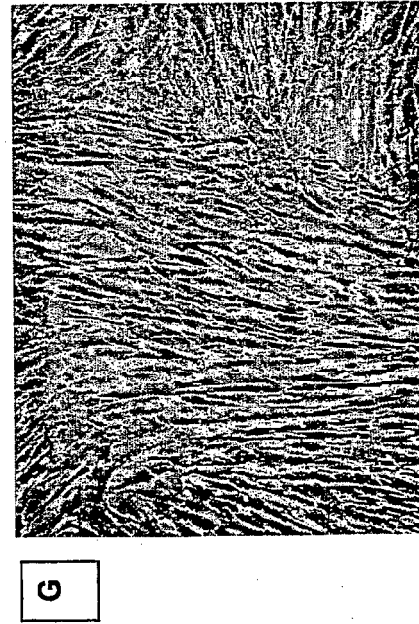
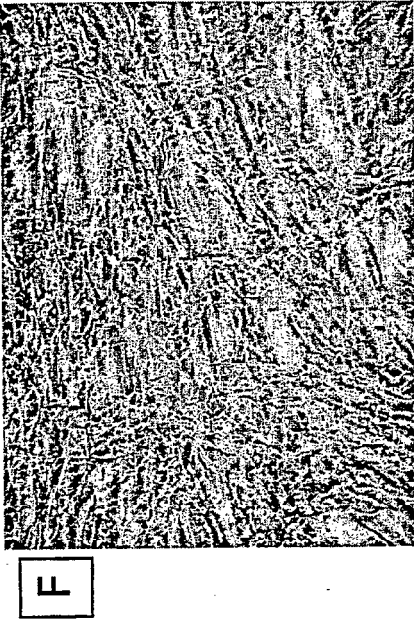
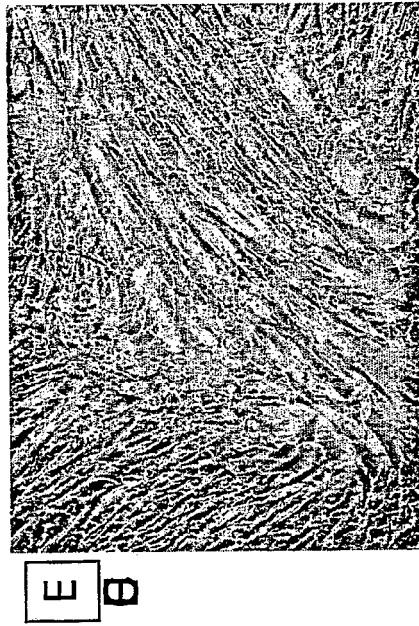
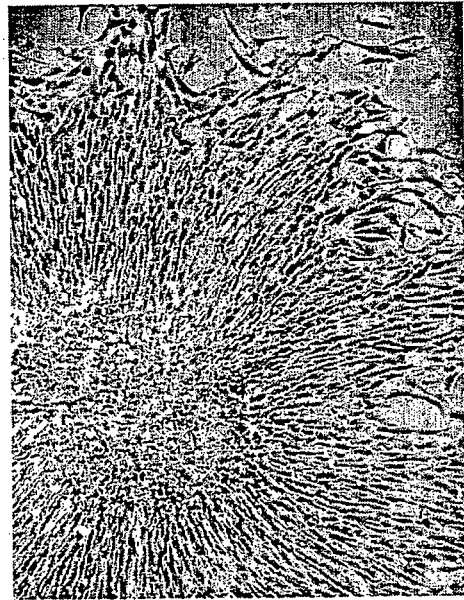
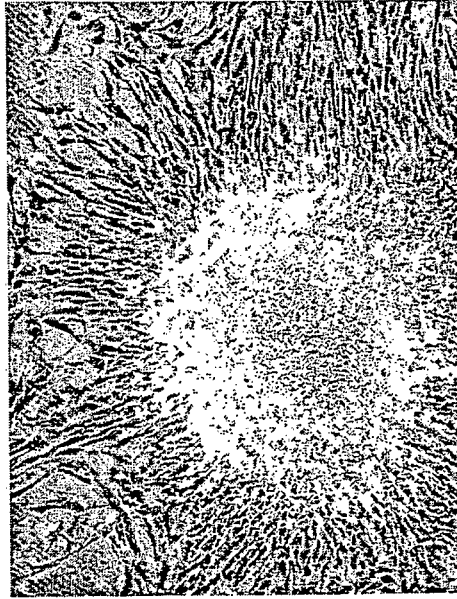


Figura 6: Formación de colonias de células madre mesenquimatosas del cordón umbilical cultivadas en condición de capa no alimentadora en DMEM/10 % de STF



Día 3

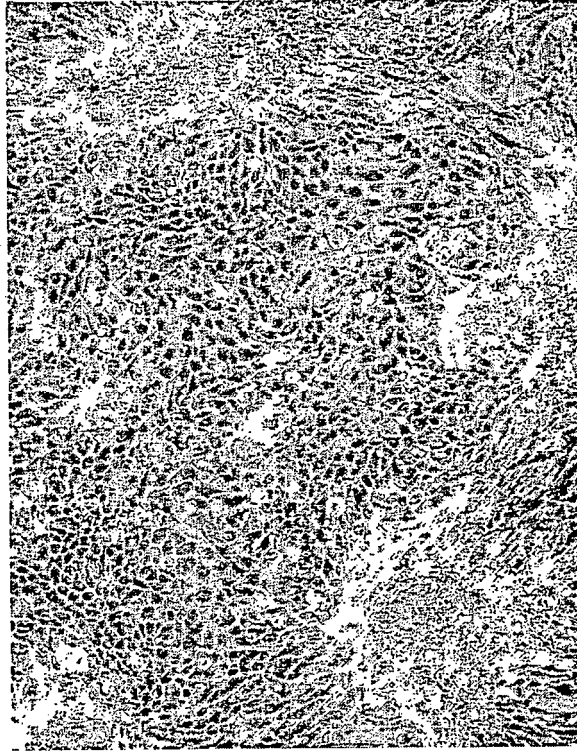


Día 7

Figura 7: Formación de colonias de células madre epiteliales del cordón umbilical cultivadas en condición de capa alimentadora en medio de Green

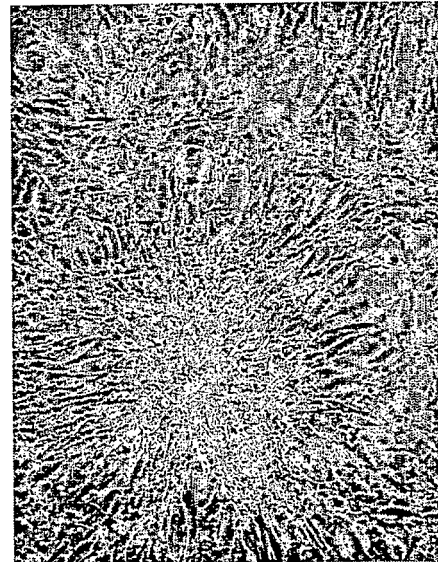
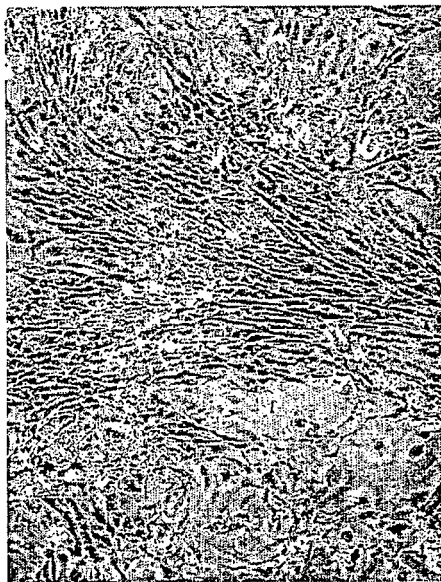


Día 3

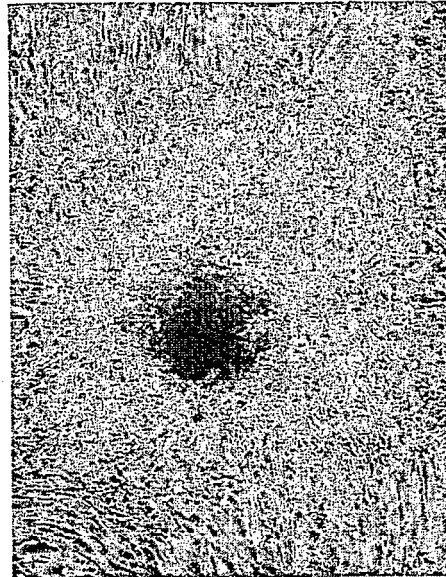
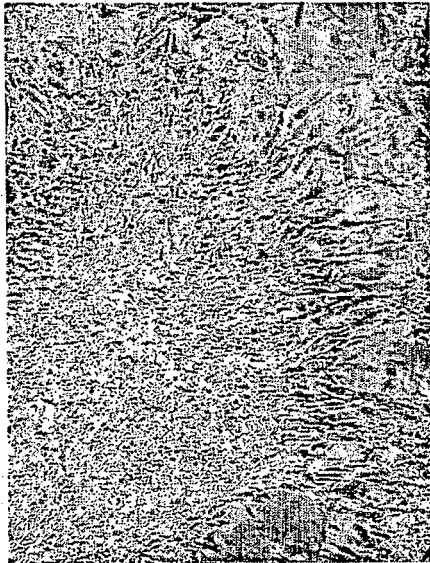


Día 7

Figura 8: Formación de colonias de células madre mesenquimatosas del cordón umbilical cultivadas sobre condición de capa alimentadora en medio de Green



Día 3



Día 7

FIGURA 9-1: Expresión de Oct-4 en células epiteliales y células mesenquimatosas del cordón umbilical

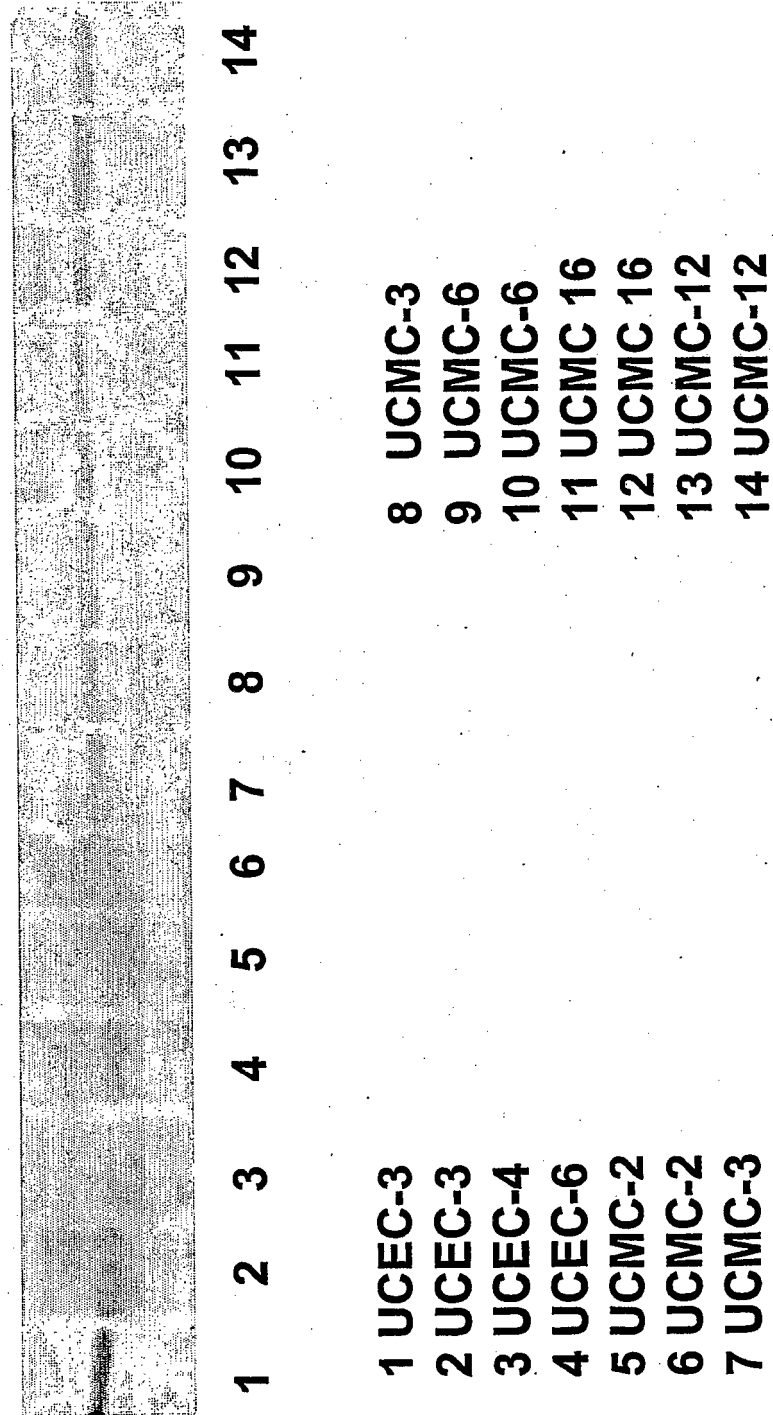


FIGURA 9-2: Expresión de STAT3 en células madre mesenquimatosas del cordón umbilical (UCMC)

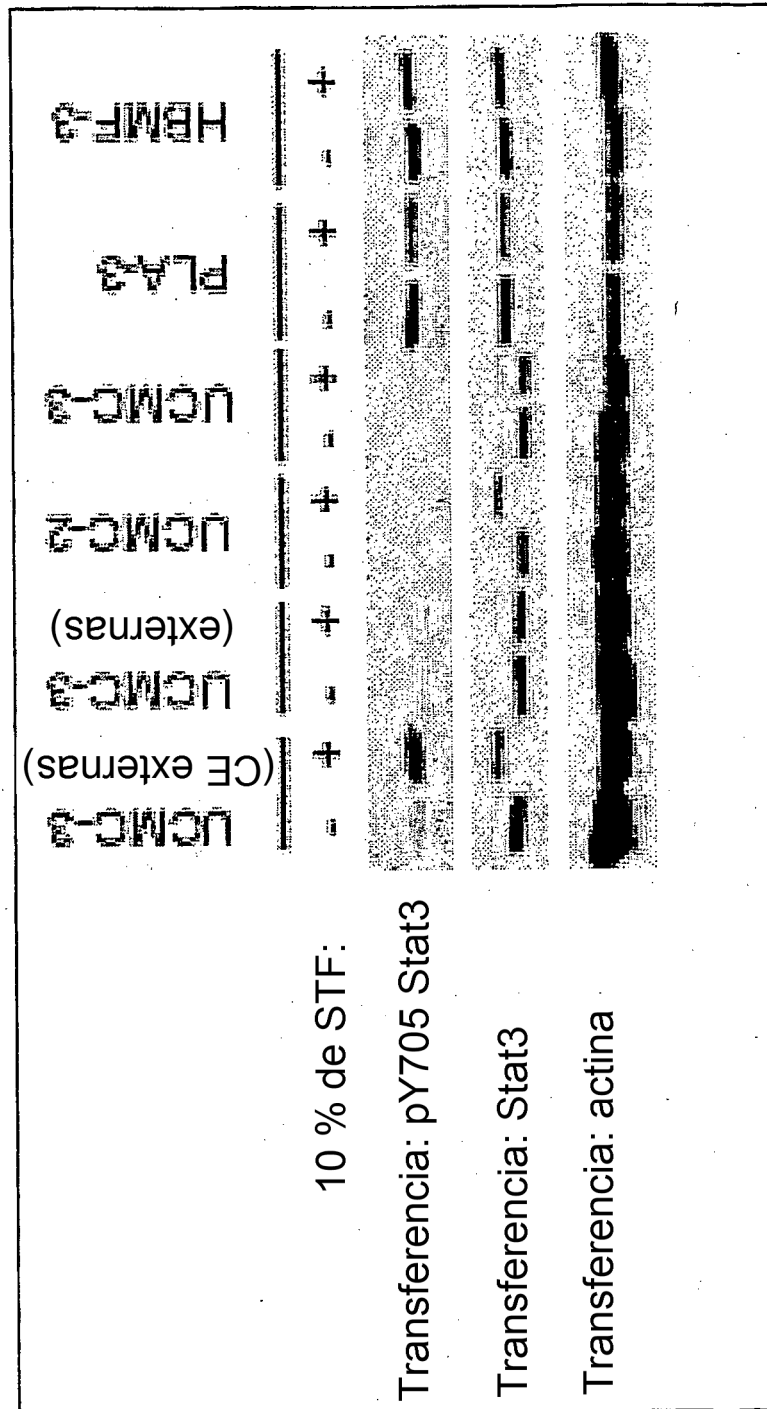


FIGURA 9-3: Expresión de STAT3 en células madre mesenquimatosas del cordón umbilical (UCMC)

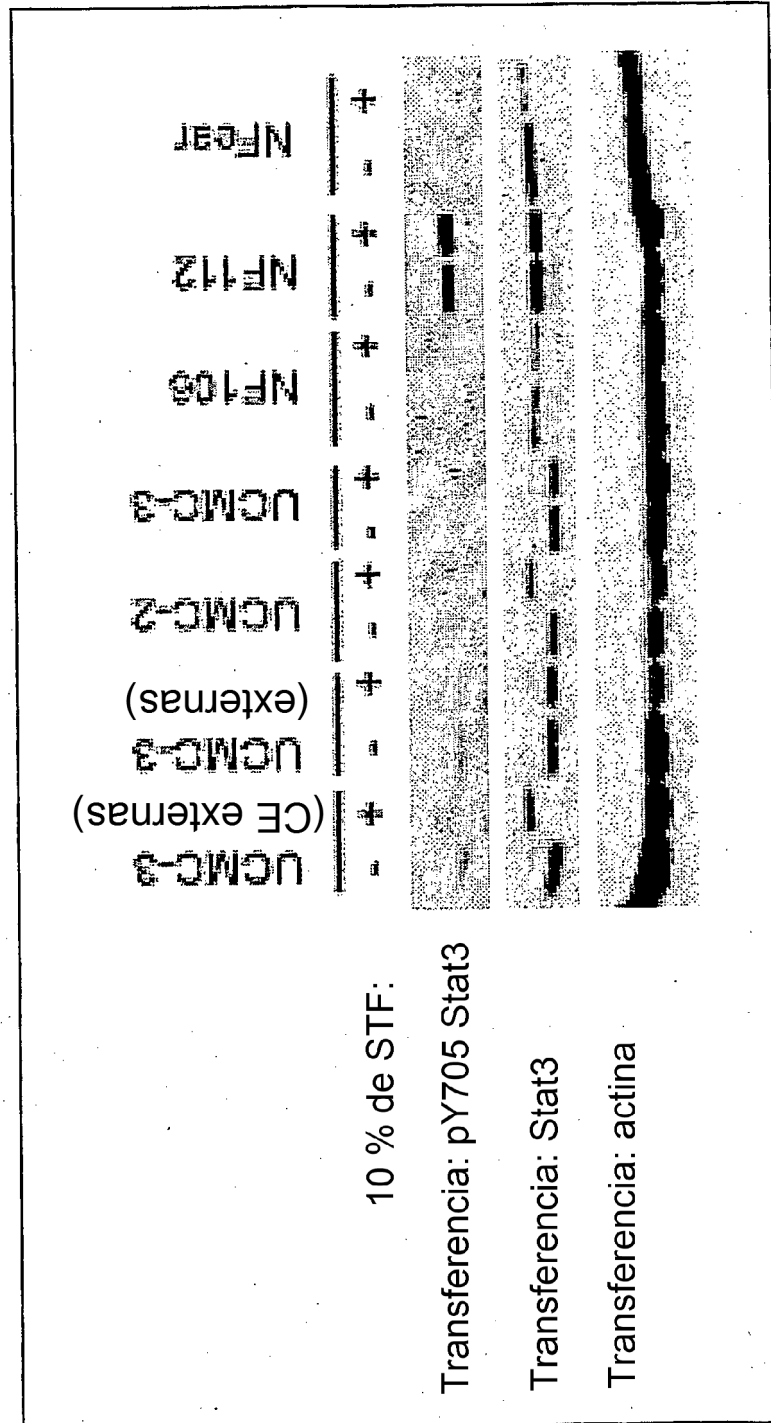


FIGURA 9-4: Expresión del factor de crecimiento placentario (PLGF) en células madre mesenquimatosas del cordón umbilical (UCMC)

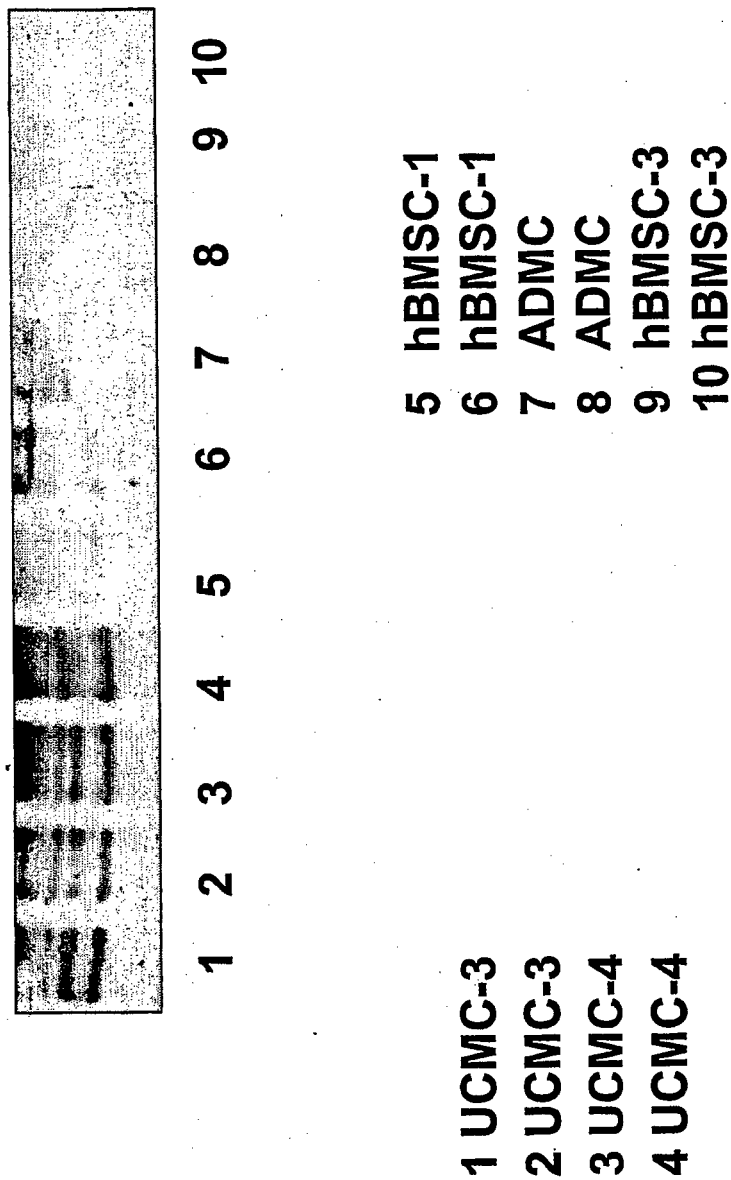


FIGURA 9-5: Expresión del factor de crecimiento placentario (PLGF) en células madre mesenquimatosas del cordón umbilical (UCMC)

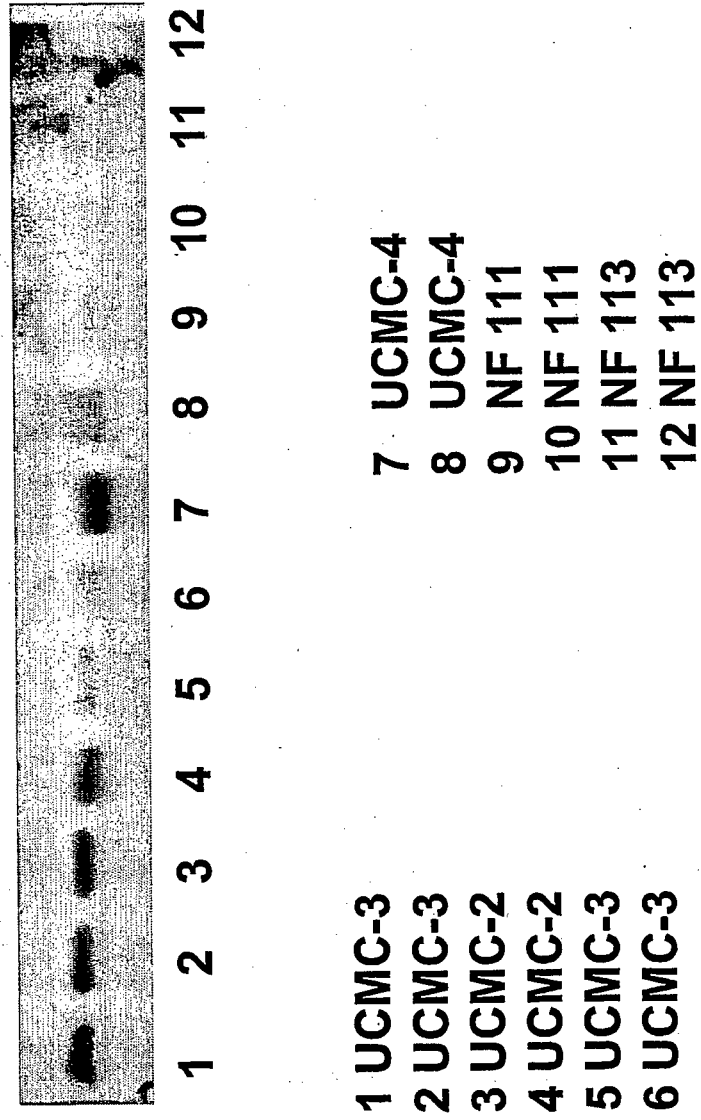


FIGURA 9-6: Expresión del factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) en células madre mesenquimatosas del cordón umbilical (UCMC)

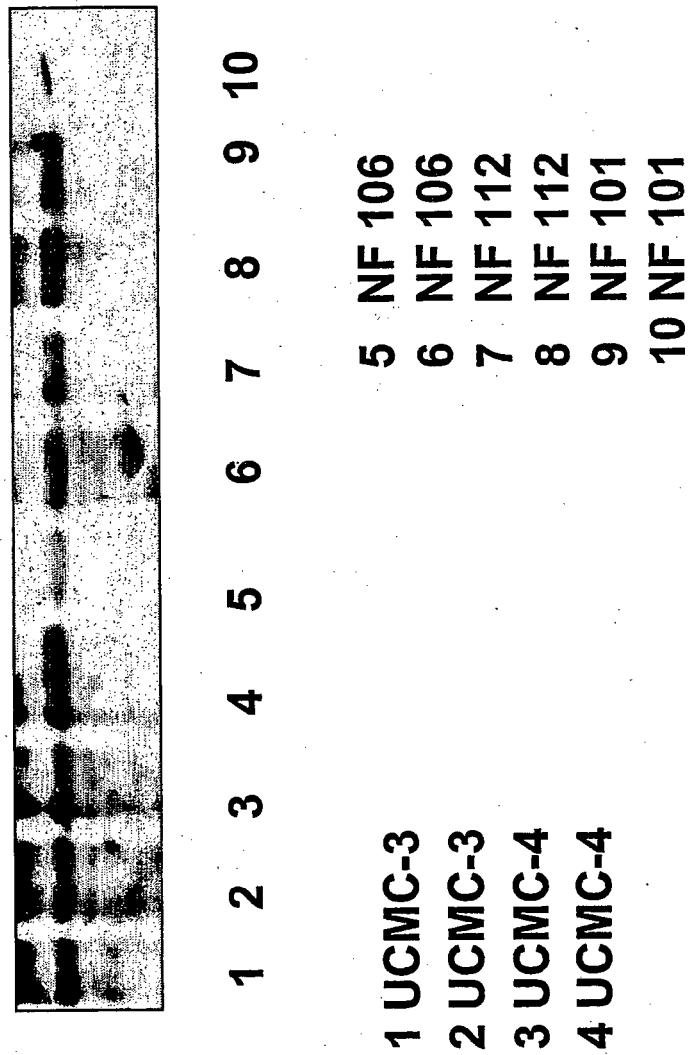


FIGURA 9-7: Expresión del factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) en células madre mesenquimatosas del cordón umbilical (UCMC)

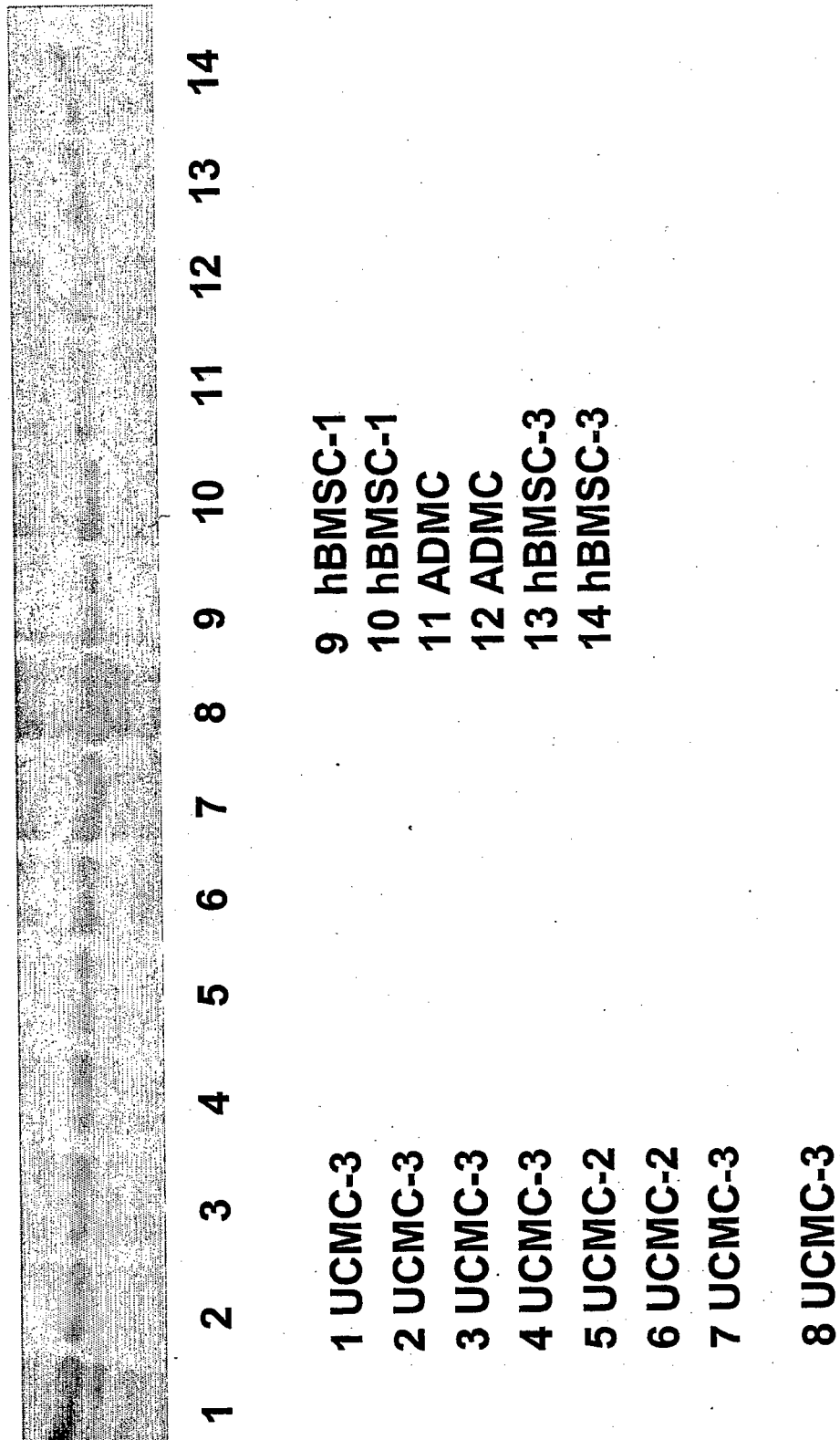


FIGURA 9-8: Expresión del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) en células madre mesenquimatosas del cordón umbilical (UCMC)

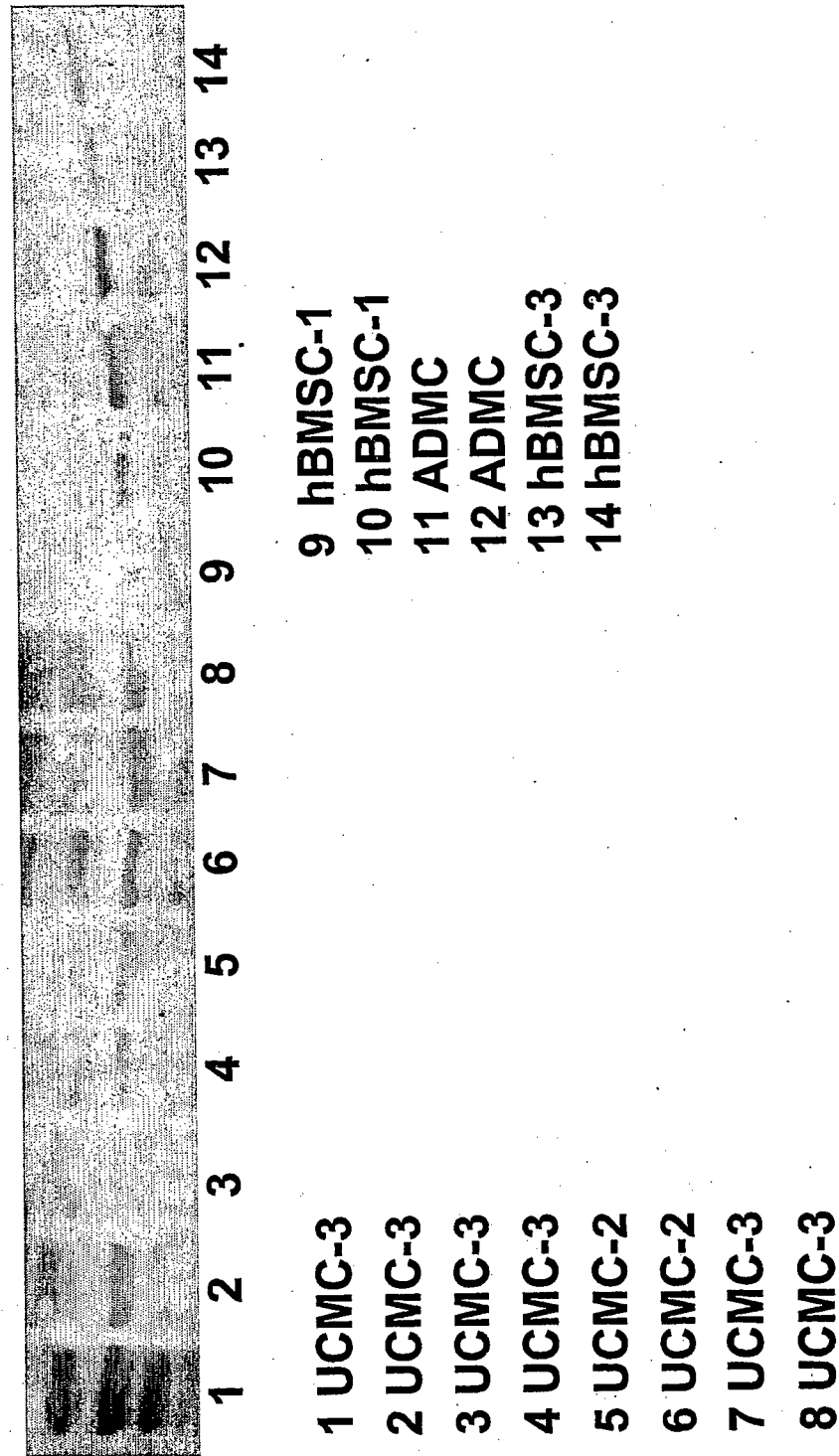


FIGURA 9-9: Expresión del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) en células madre mesenquimatosas del cordón umbilical (UCMC)

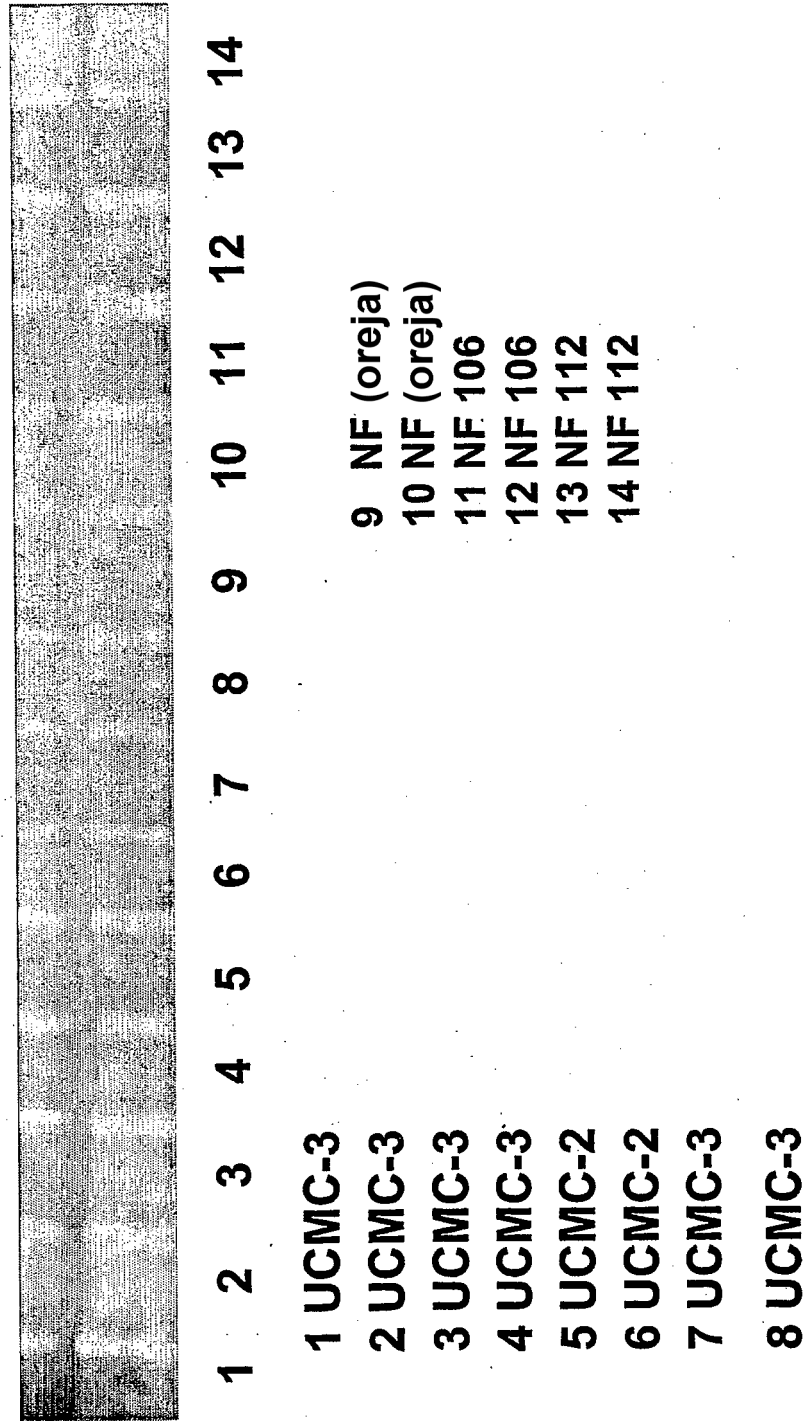


FIGURA 9-10: Expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en células madre mesenquimatosas del cordón umbilical (UCMC)

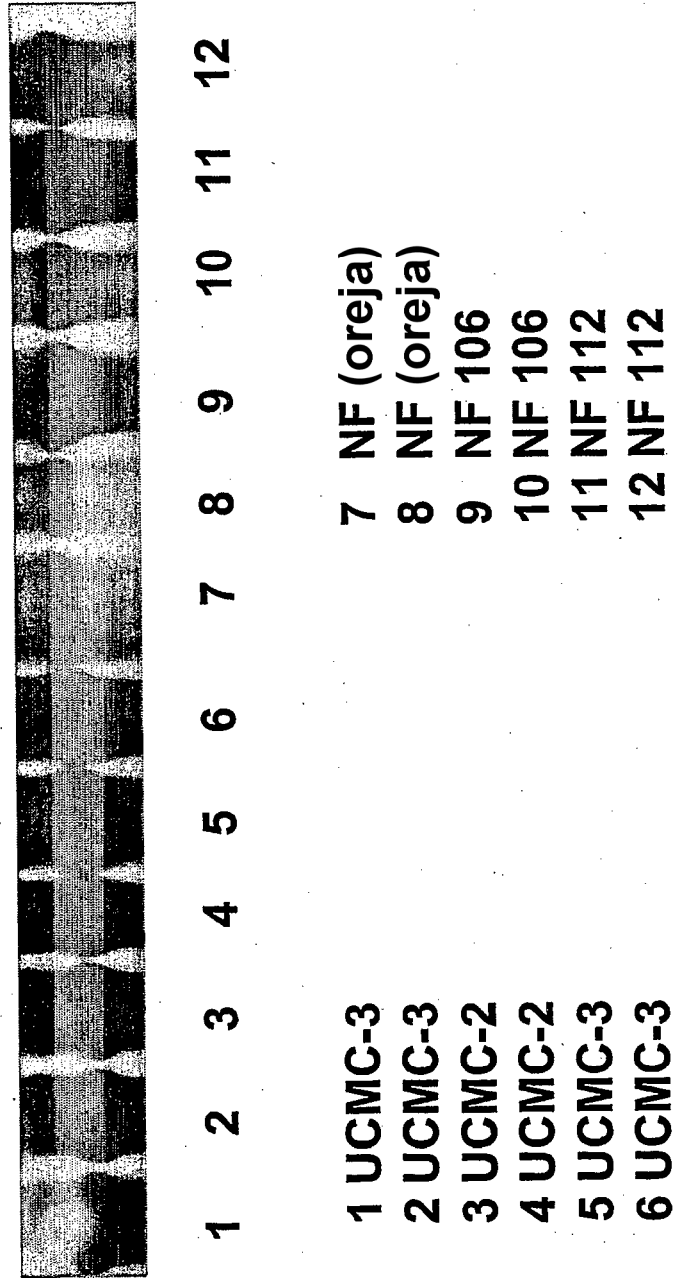


FIGURA 9-11: Expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en células madre mesenquimatosas del cordón umbilical (UCMC)

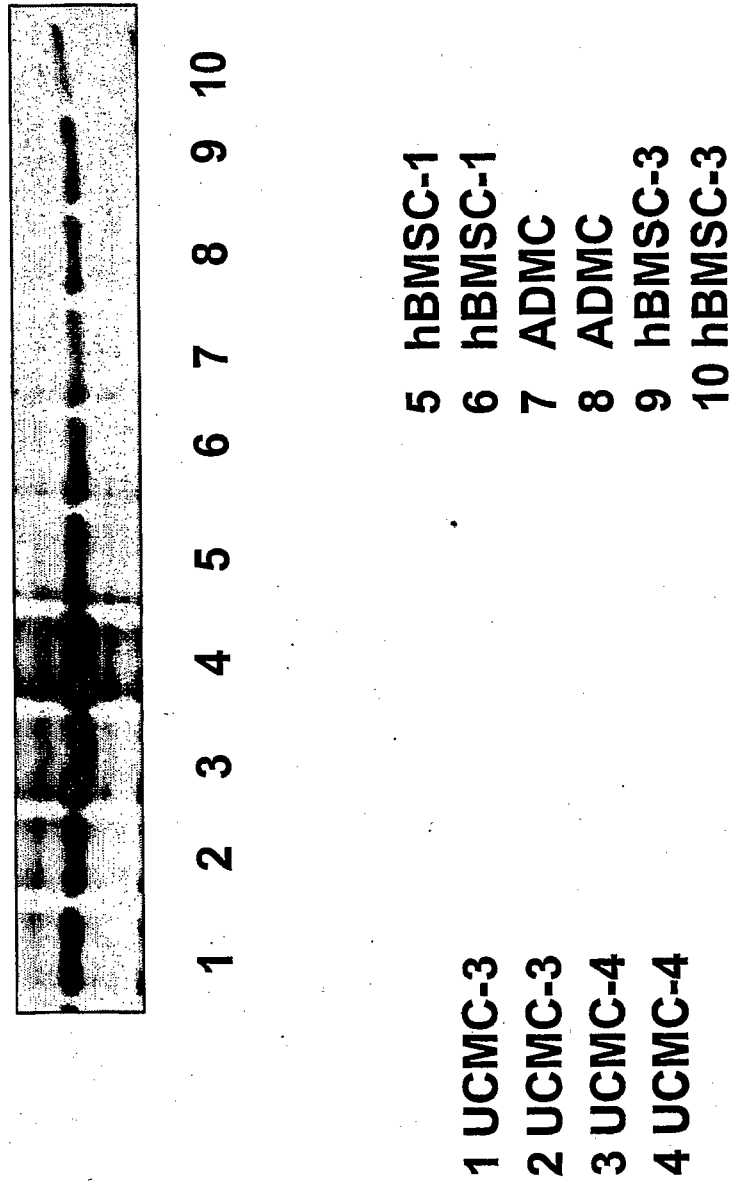


FIGURA 9-12: Expresión del factor 2 de crecimiento de fibroblastos (FGF-2) en células madre mesenquimatosas del cordón umbilical (UCMC)

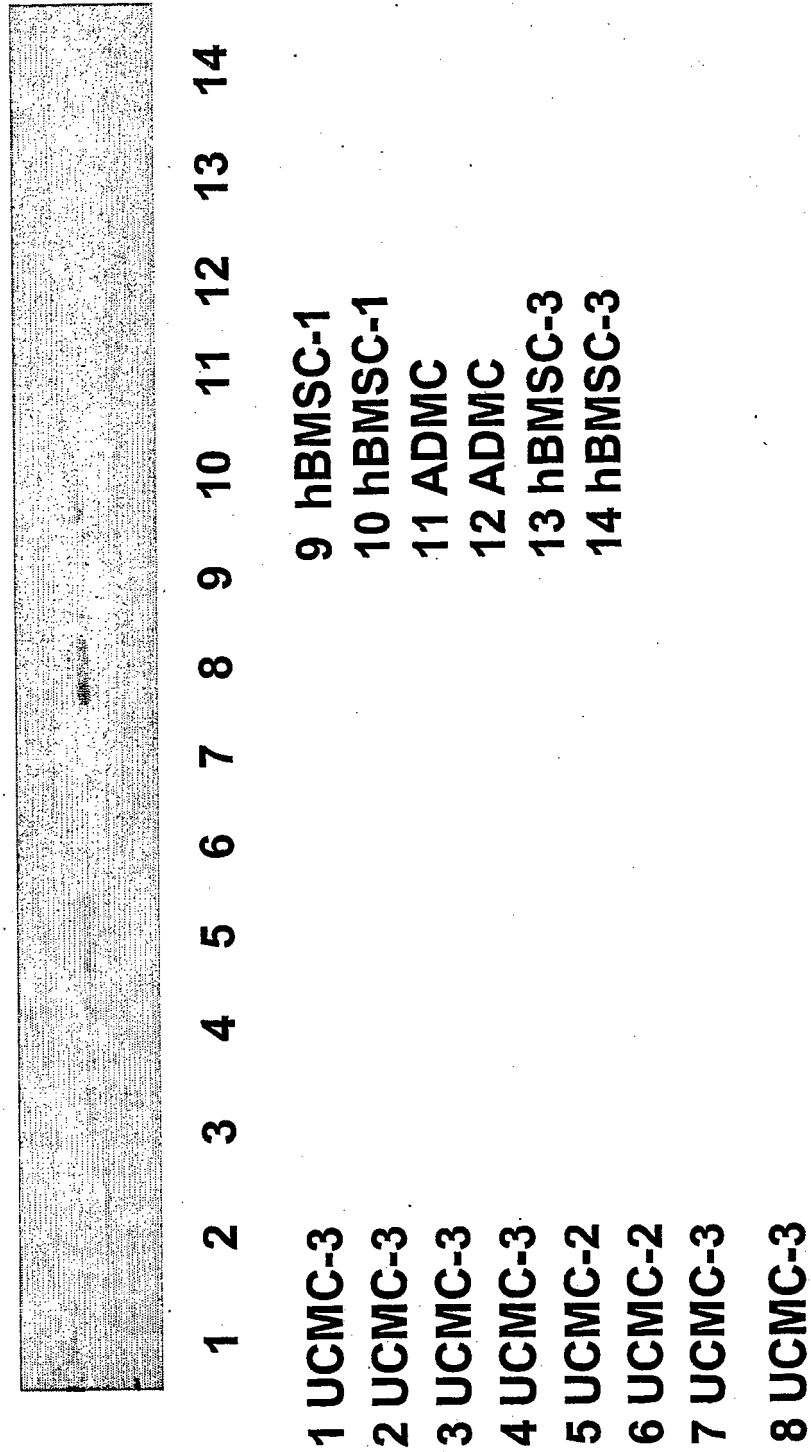


FIGURA 9-13: Expresión del factor 2 de crecimiento de fibroblastos (FGF-2) en células madre mesenquimatosas del cordón umbilical (UCMC)

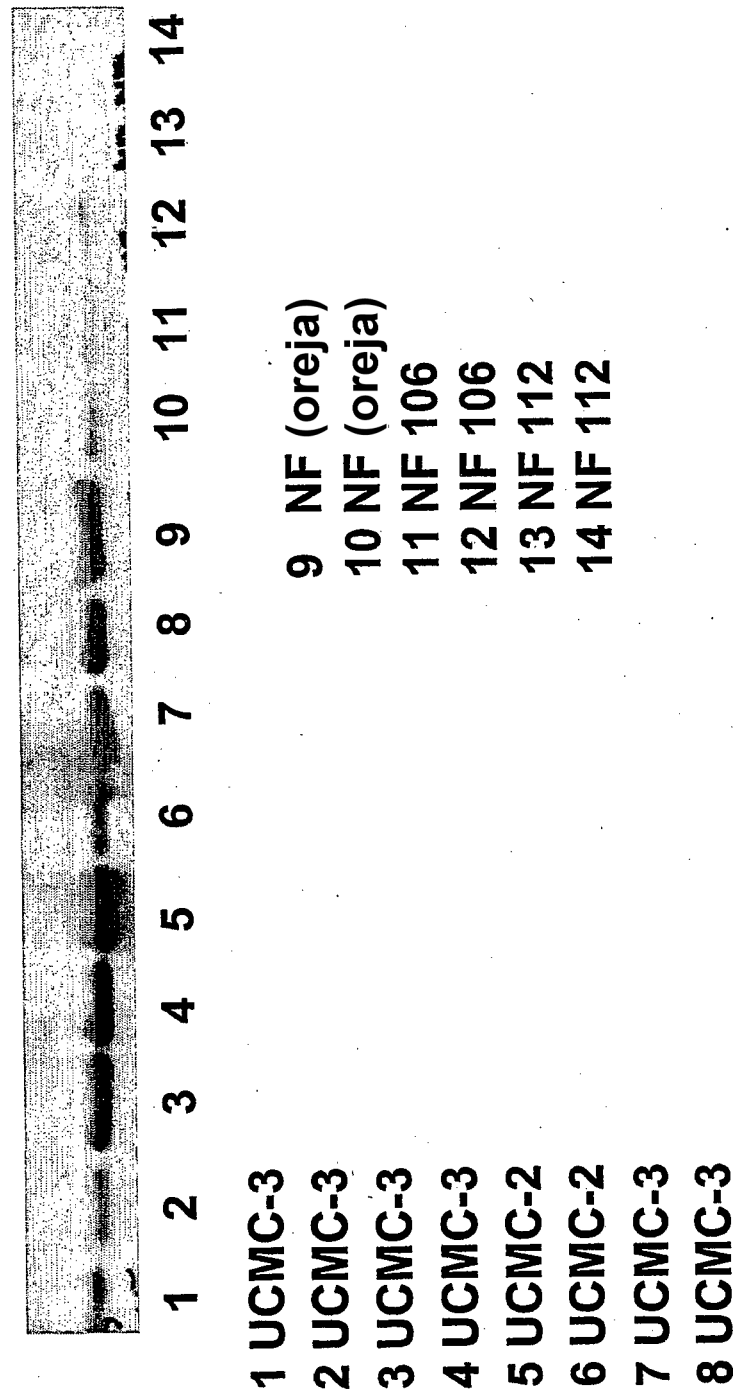


FIGURA 9-14: Expresión del factor de crecimiento derivado de hepatoma (HDGF) en células madre mesenquimatosas del cordón umbilical (UCMC)

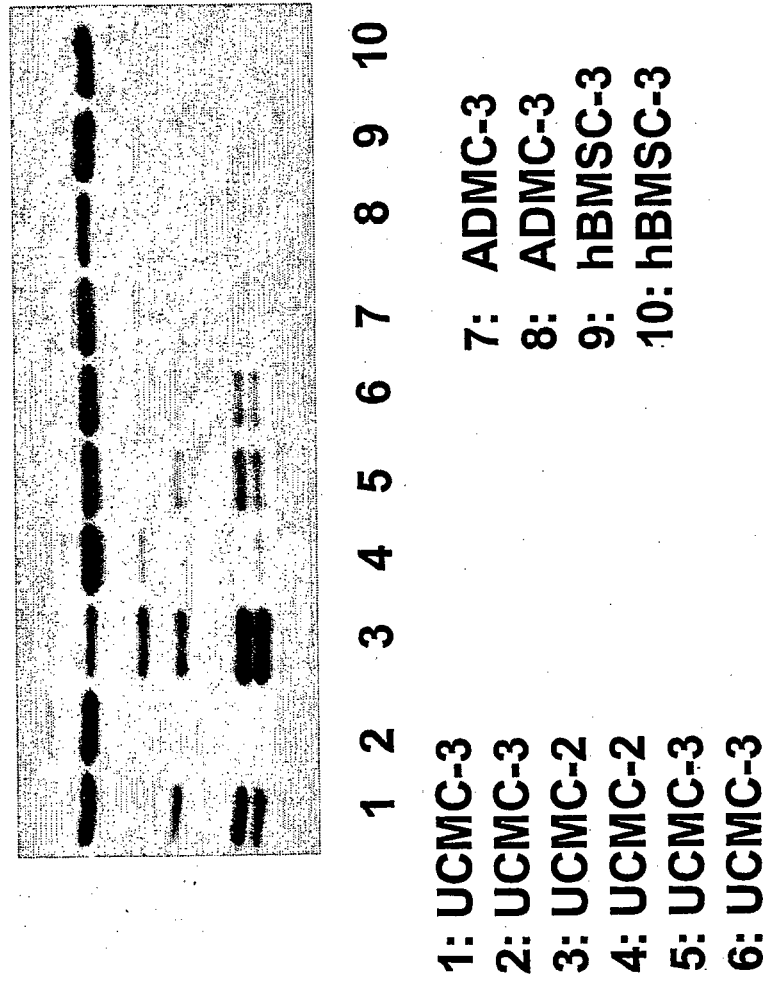


FIGURA 9-15: Expresión del factor de crecimiento derivado de hepatoma (HDGF) en células madre mesenquimatosas del cordón umbilical (UCMC)

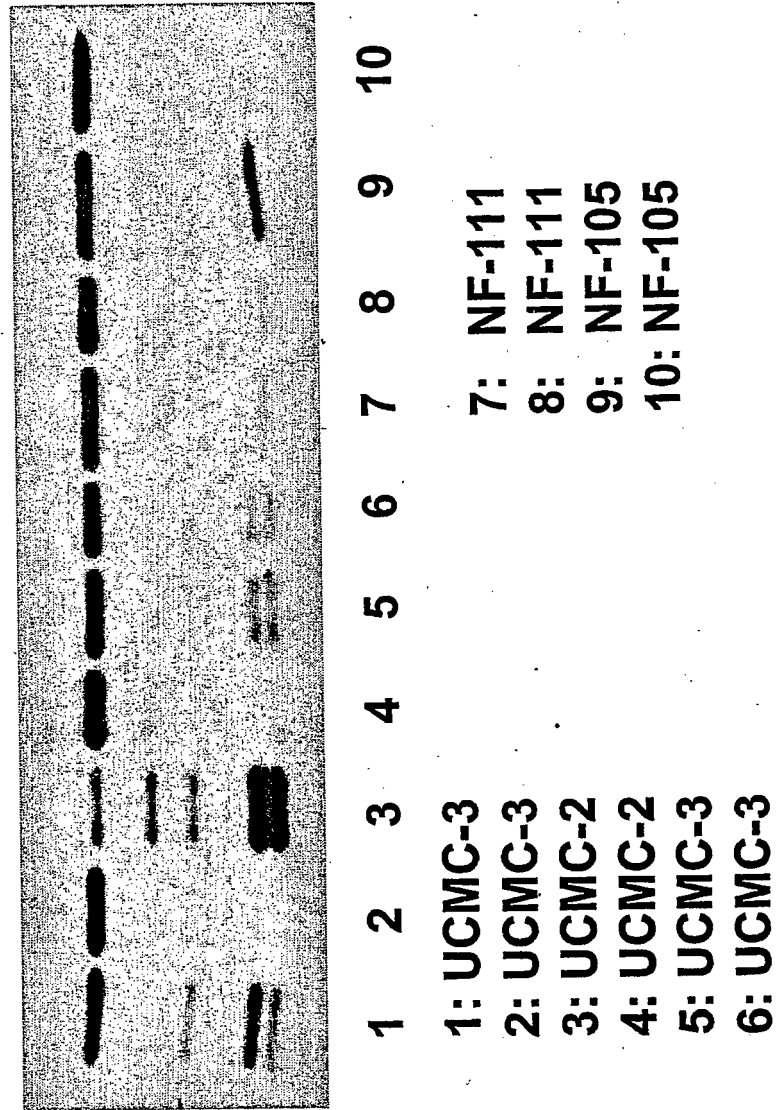


FIGURA 9-16: Expresión del factor de crecimiento de células madre (SCF) en células madre mesenquimatosas del cordón umbilical (UCMC)

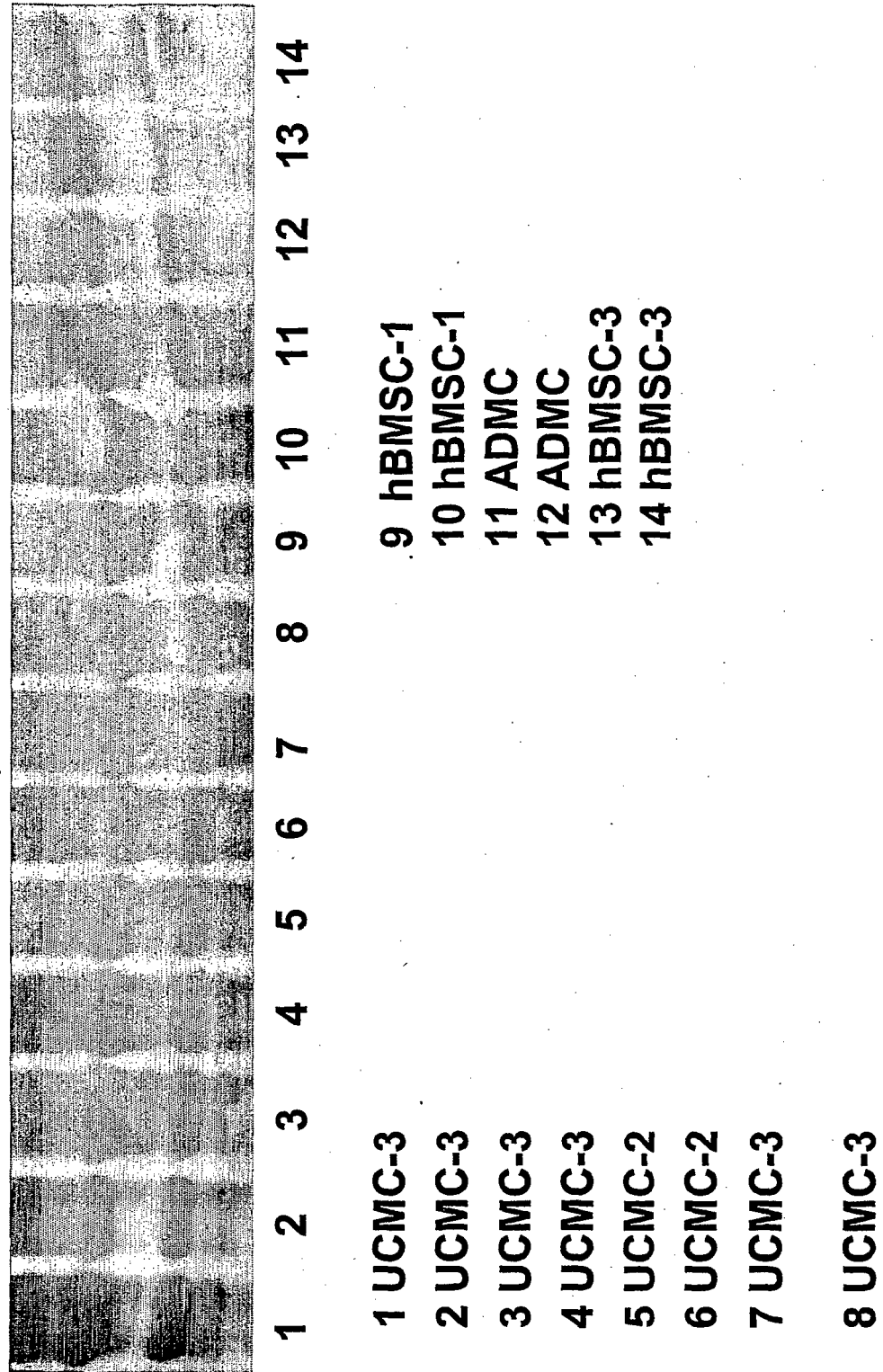


FIGURA 9-17: Expresión de alfa-actina de músculo liso (α -SMA) en células madre mesenquimatosas del cordón umbilical (UCMC)

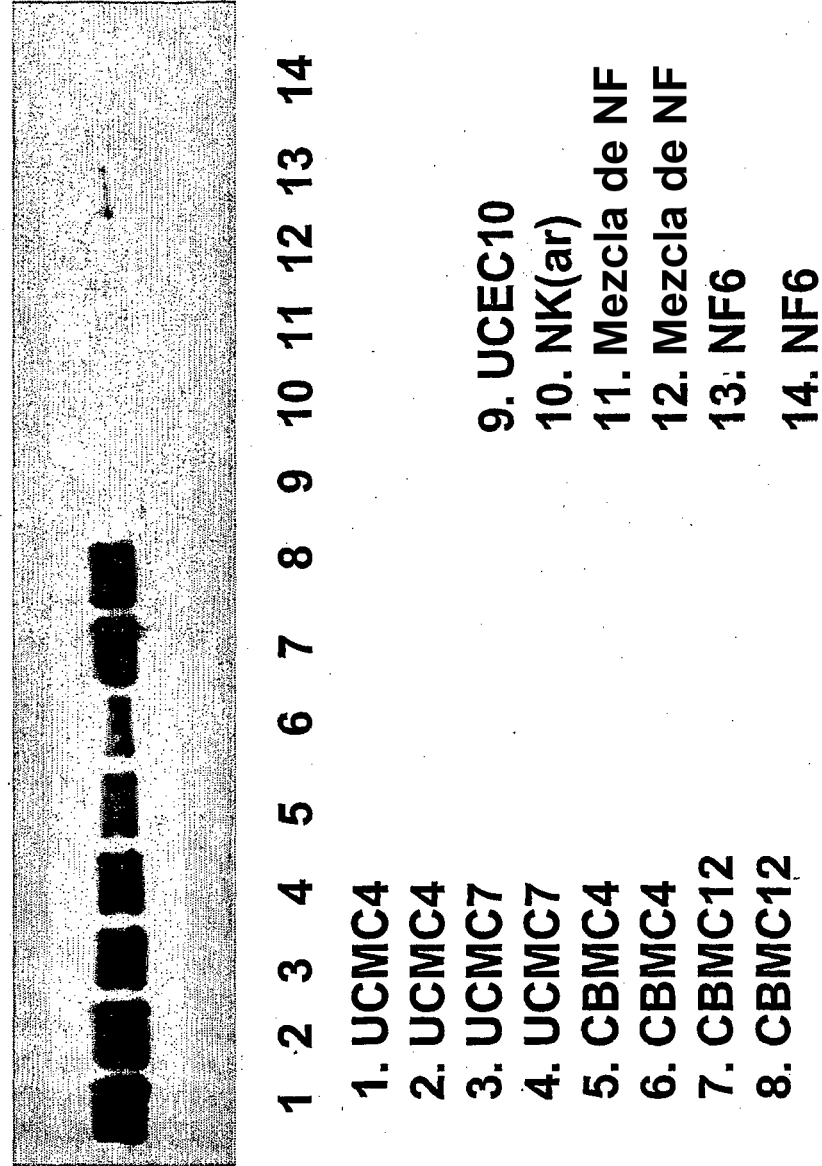


FIGURA 9-18: Expresión de fibronectina en células madre mesenquimatosas del cordón umbilical (UCMC)

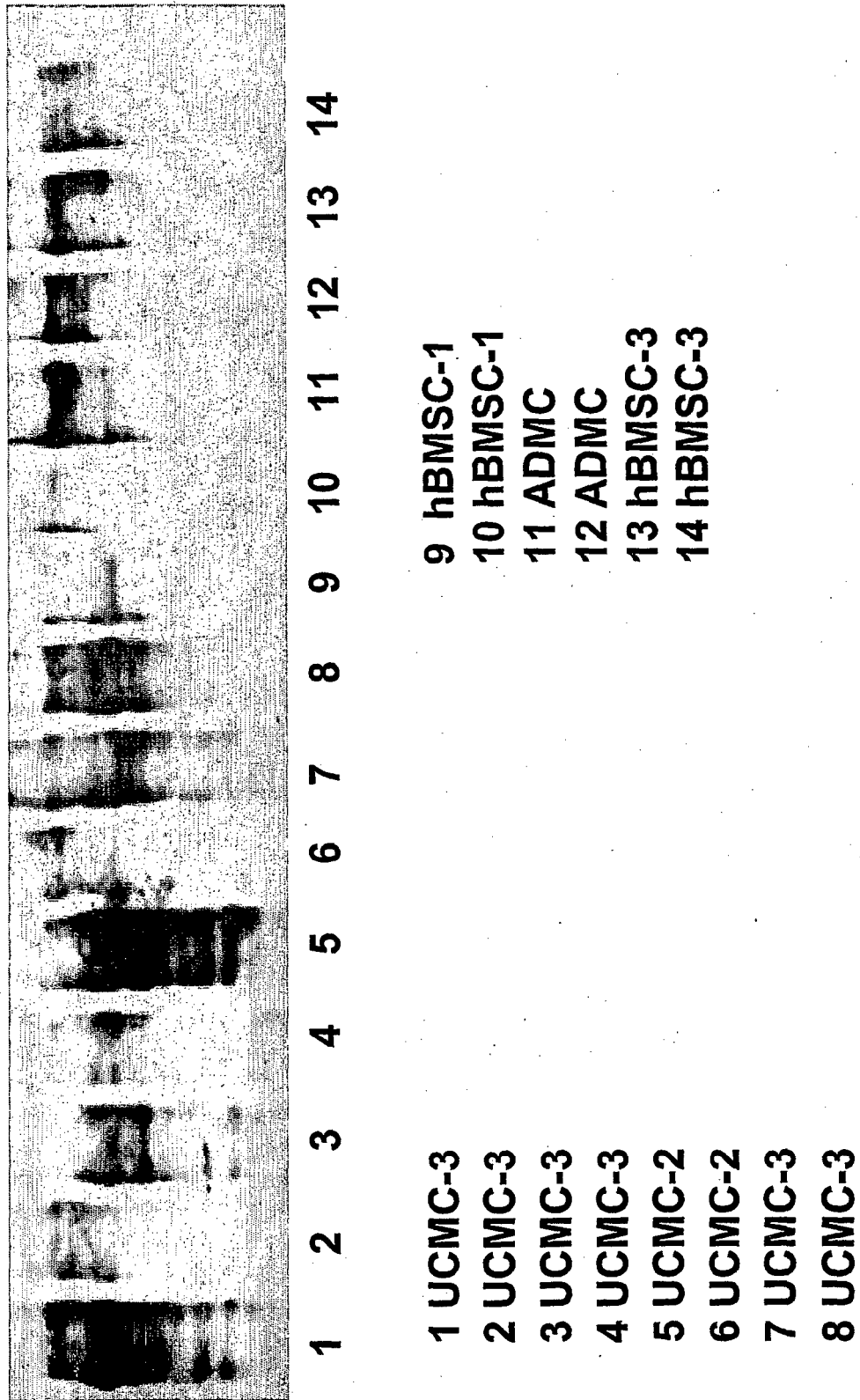


FIGURA 9-19: Expresión de fibronectina en células madre mesenquimatosas del cordón umbilical (UCMC)

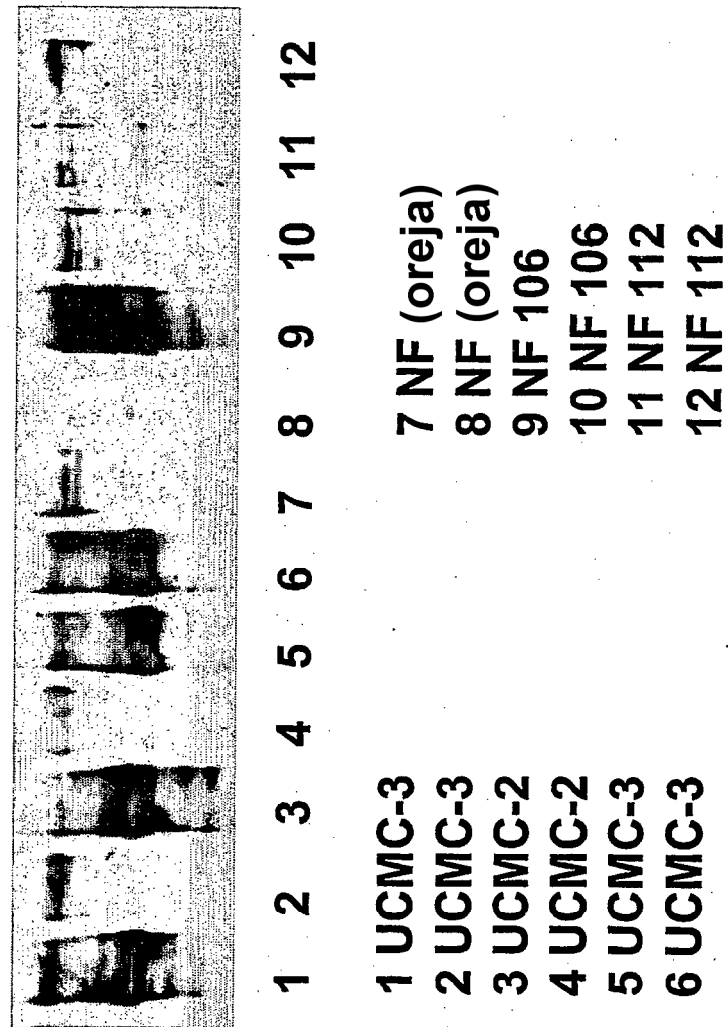


FIGURA 9-20: Expresión de decorina en células madre mesenquimatosas del cordón umbilical (UCMC)



FIGURA 9-21: Expresión de sindecano-1 en células madre mesenquimatosas del cordón umbilical (UCMC)

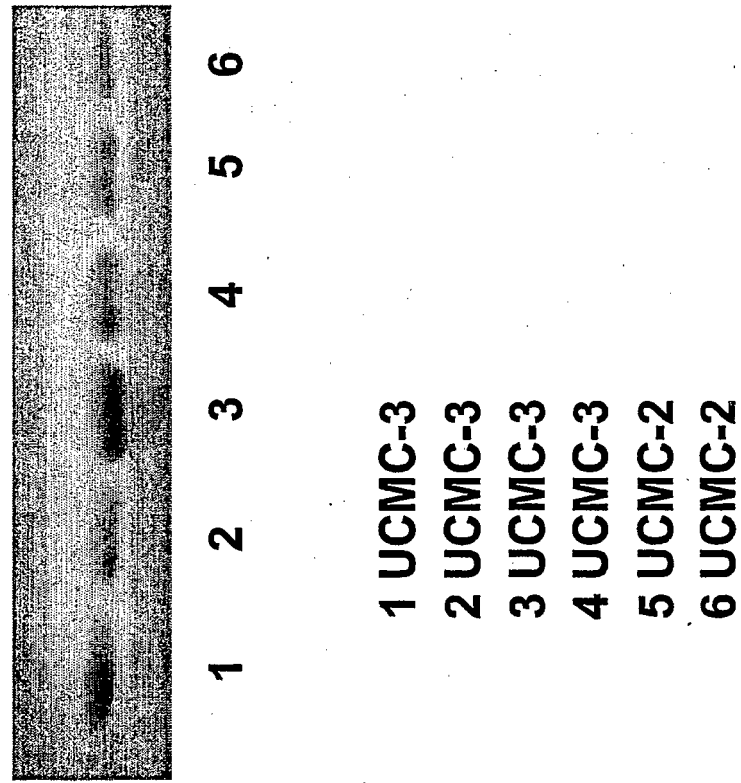


FIGURA 9-22: Expresión de sindecano-2 en células madre mesenquimatosas del cordón umbilical (UCMC)

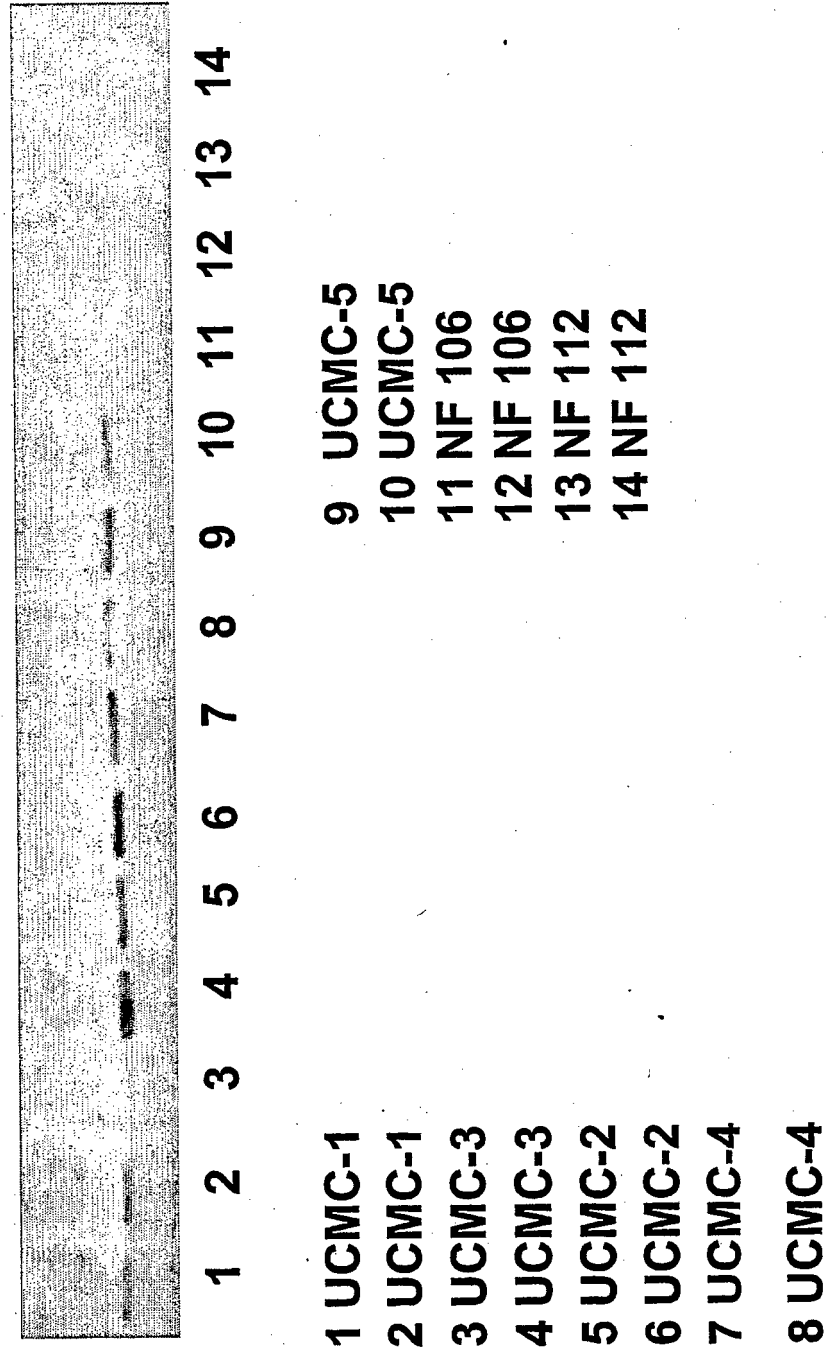


FIGURA 9-23: Expresión de sindecano-2 en células madre mesenquimatosas del cordón umbilical (UCMC)

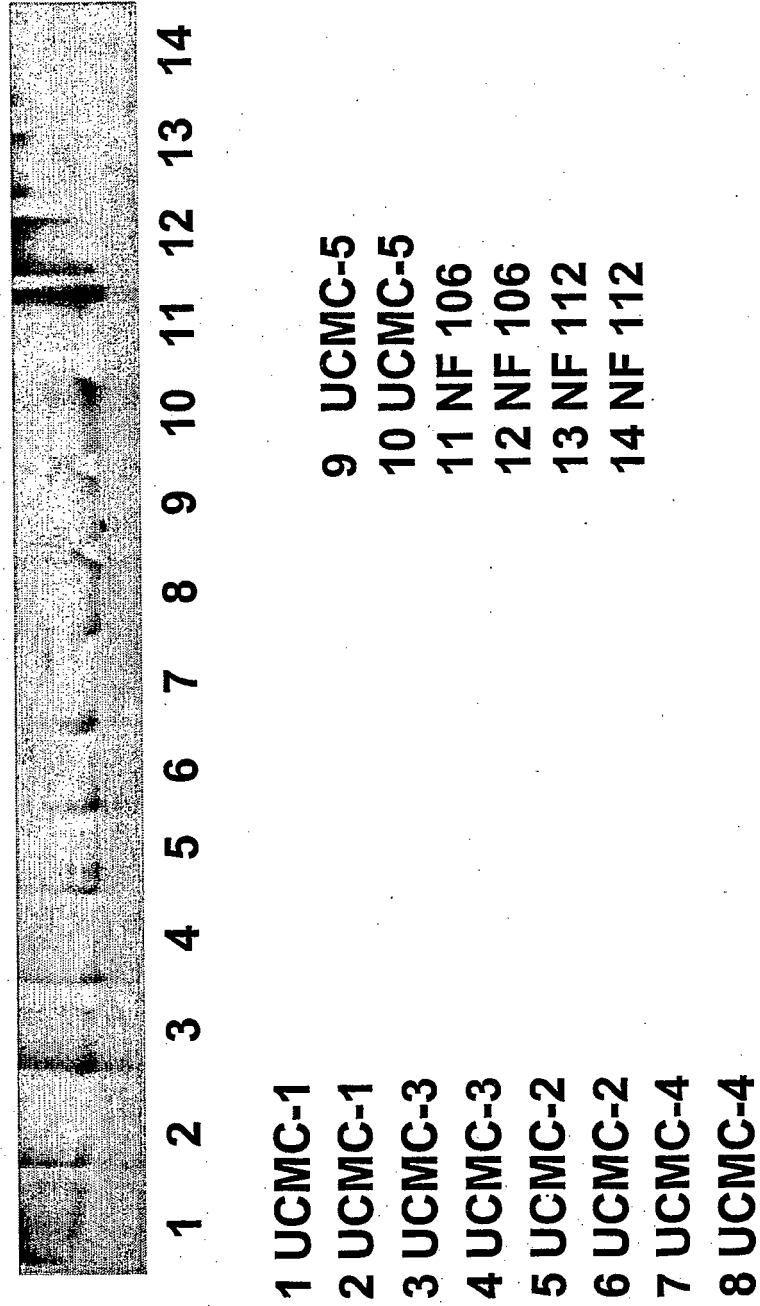


FIGURA 9-24: Expresión de sindecano-3 en células madre mesenquimatosas del cordón umbilical (UCMC)

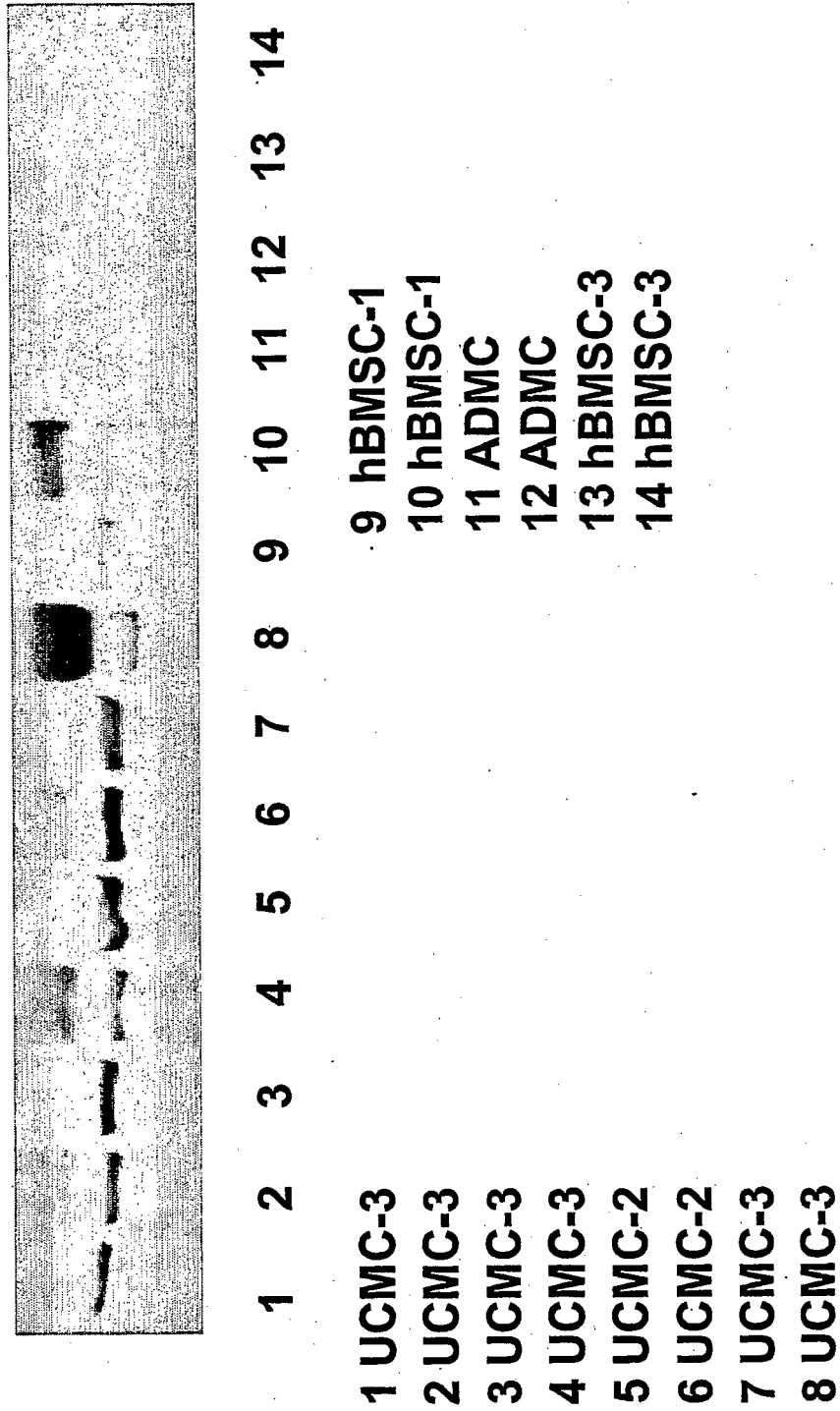


FIGURA 9-25: Expresión de sindecano-3 en células madre mesenquimatosas del cordón umbilical (UCMC)

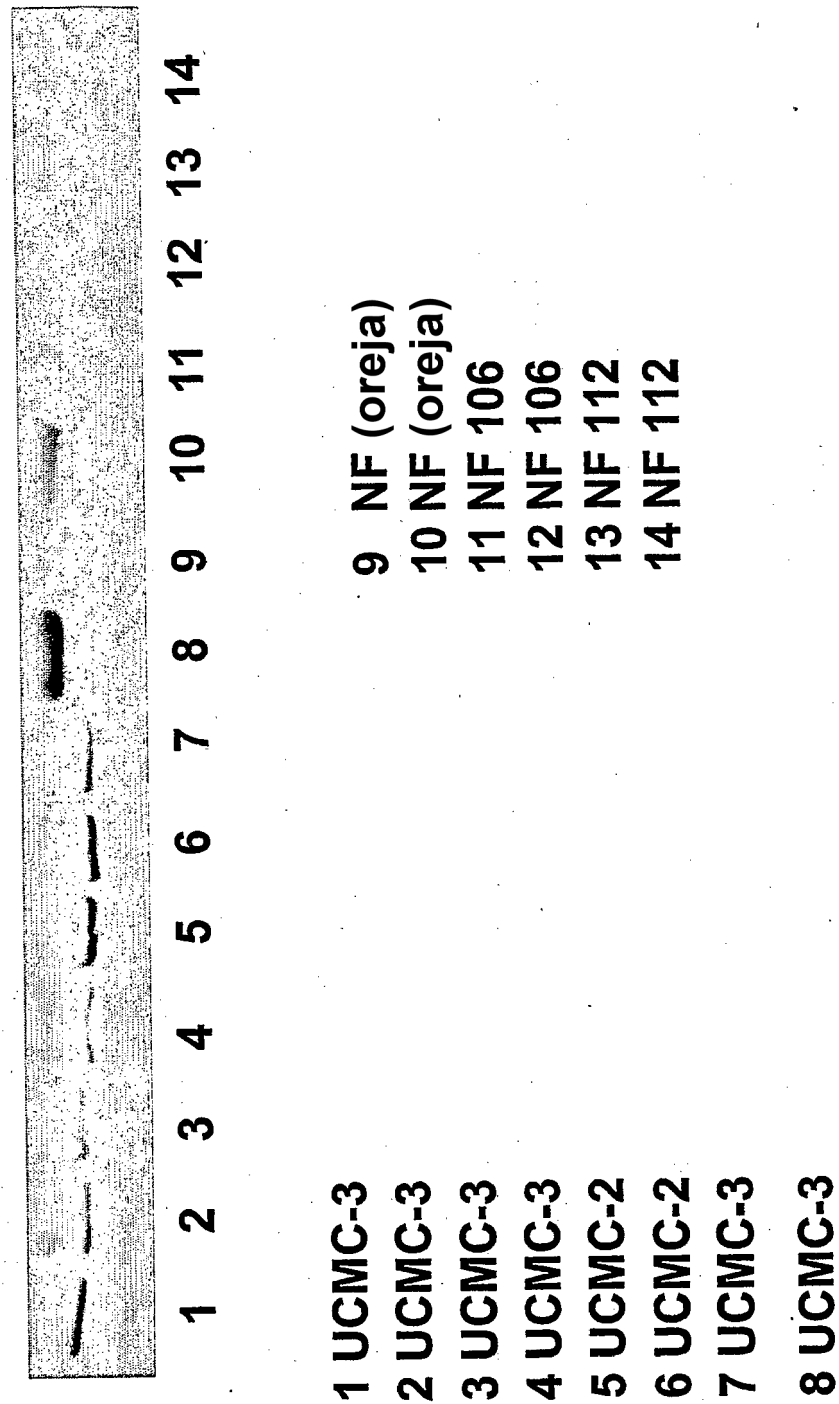


FIGURA 9-26: Expresión de sindecano-4 en células madre mesenquimatosas del cordón umbilical (UCMC)

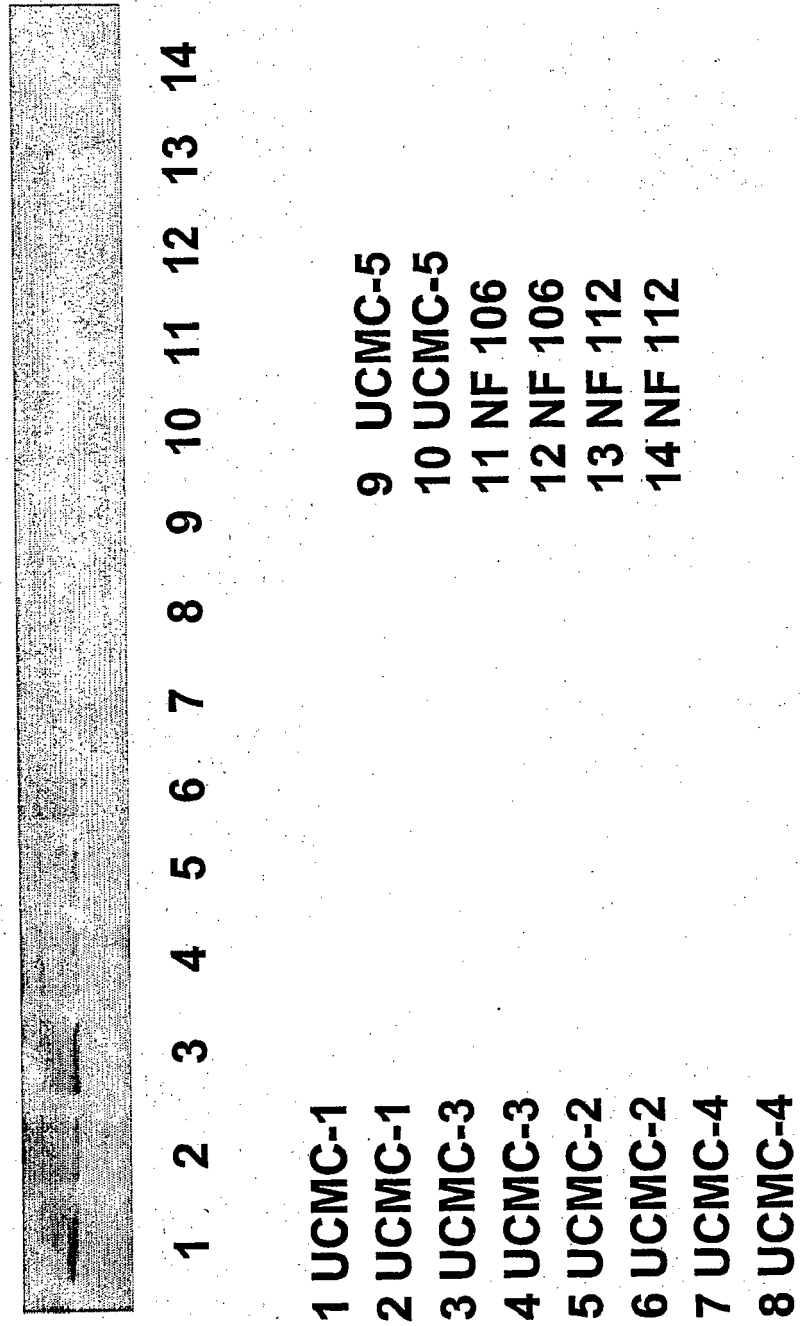


FIGURA 10-1: Expresión de citoqueratinas en células epiteliales del cordón umbilical

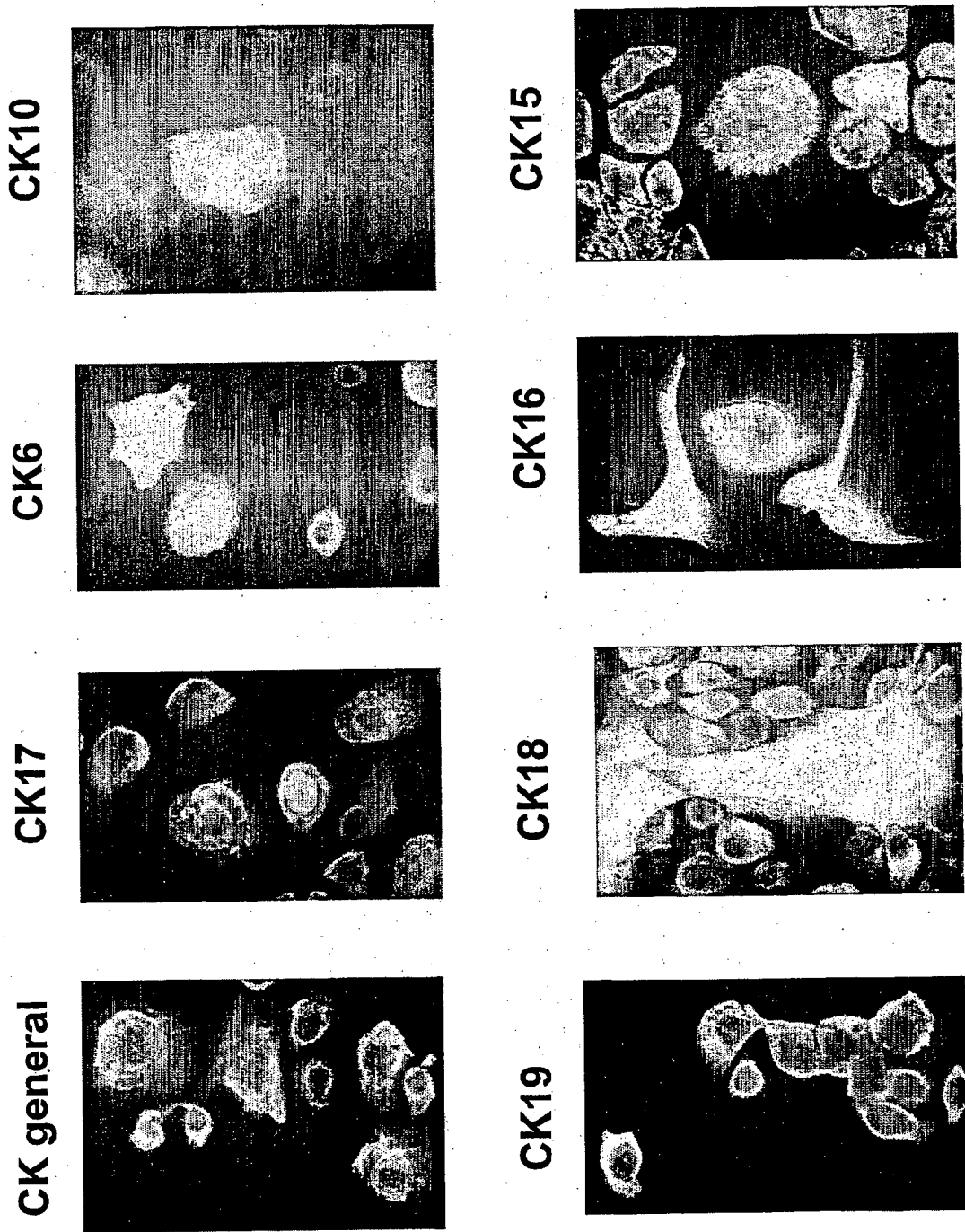
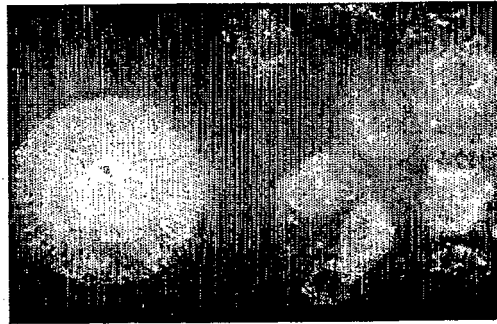


FIGURA 10-2: Expresión de hemidesmosoma y desmosoma en células
epiteliales del cordón umbilical

Integrina $\alpha 6$



Integrina $\beta 4$



Desmosoma

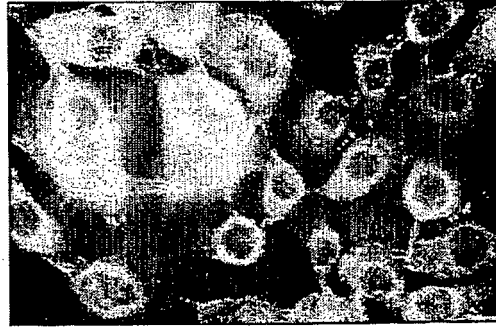


FIGURA 10-3: Expresión de proteínas de la membrana basal en células epiteliales del cordón umbilical

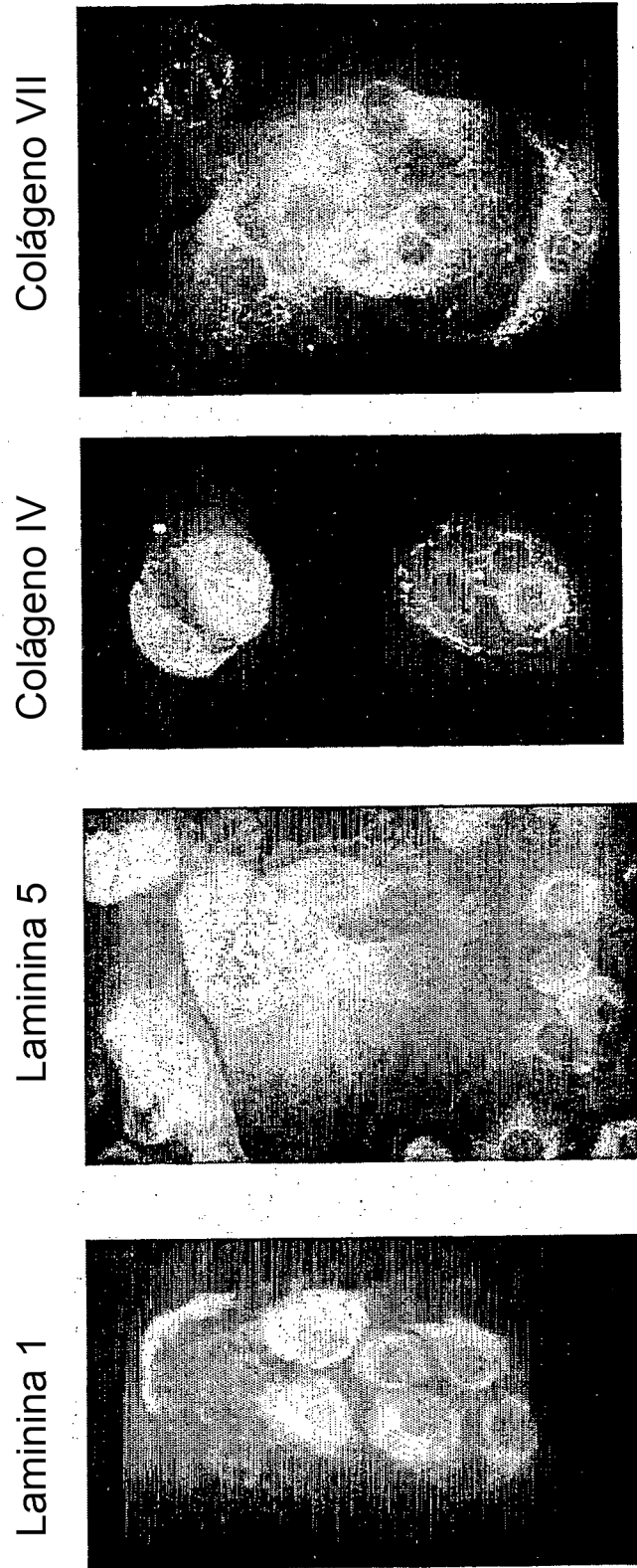
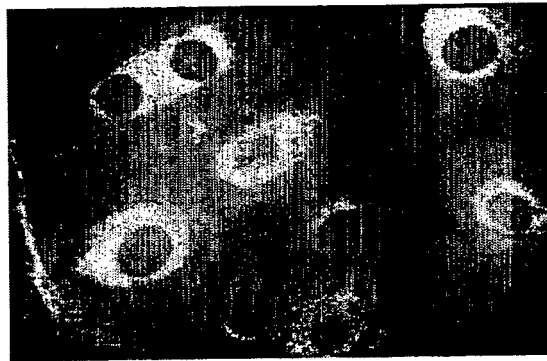


FIGURA 10-4: Expresión de integrina $\beta 1$ y fibronectina en células epiteliales del cordón umbilical

Integrina $\beta 1$



Fibronectina

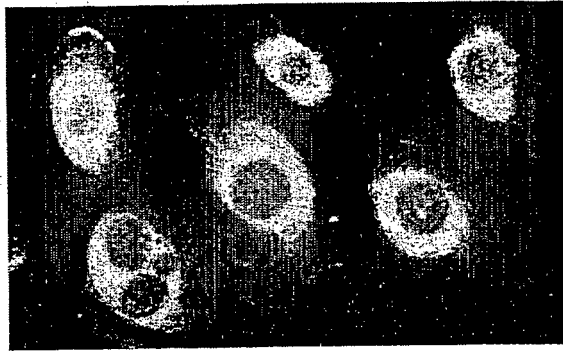


FIGURA 11: Perfil de expresión de citocinas y factores de crecimiento secretados por células mesenquimatosas del cordón umbilical

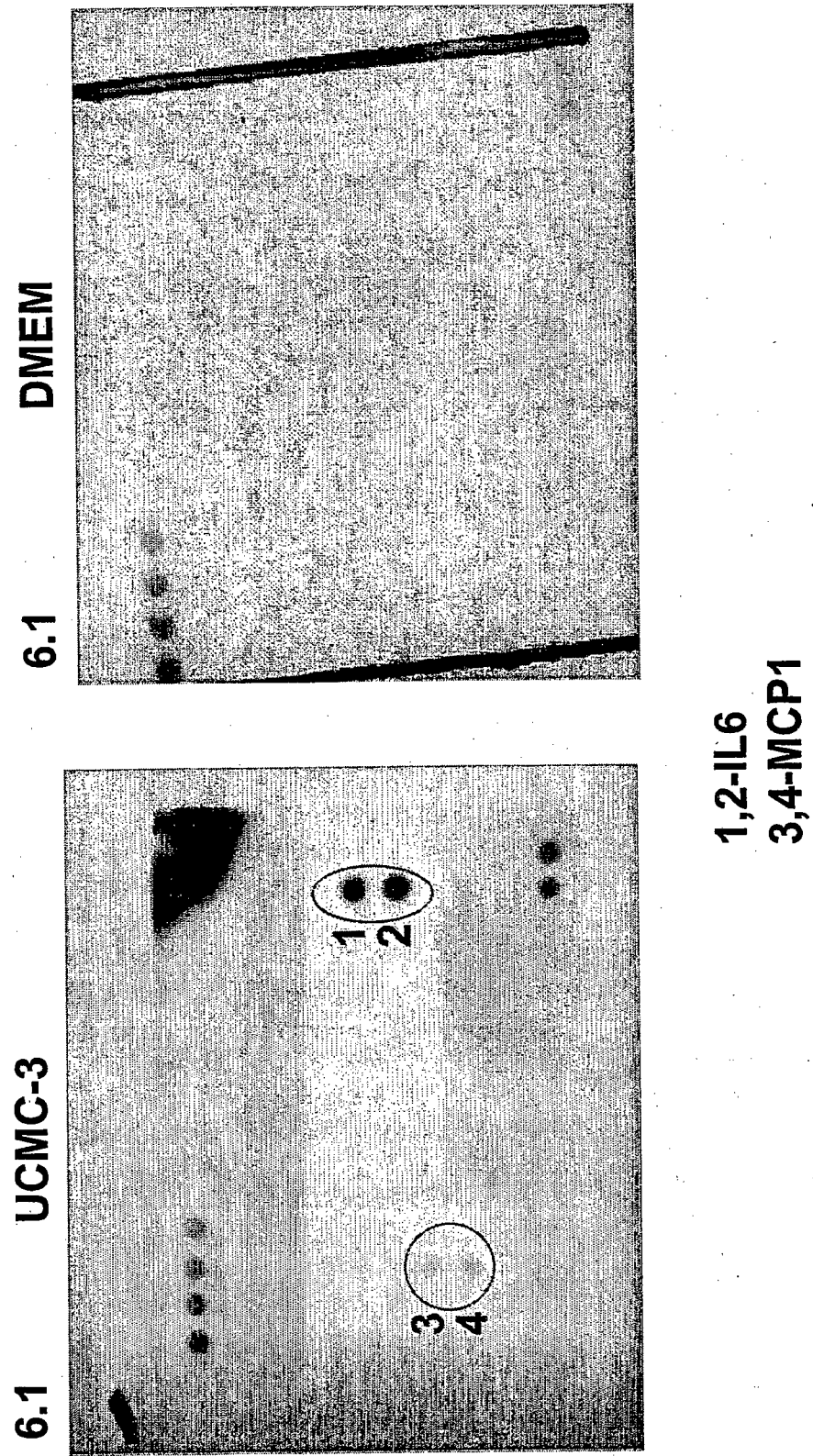


FIGURA 11: Perfil de expresión de citocinas y factores de crecimiento secretados por células mesenquimatosas del cordón umbilical

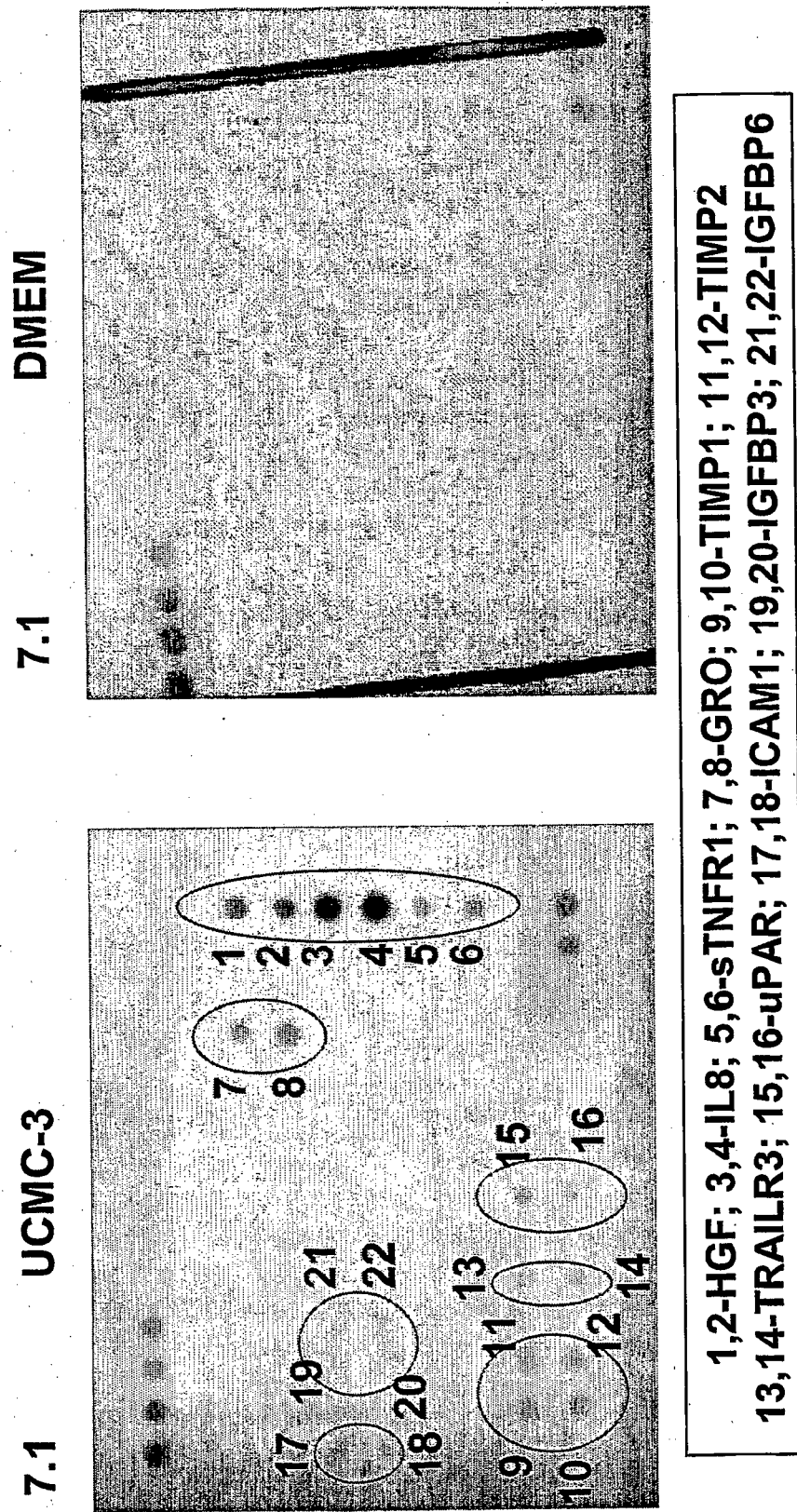


FIGURA 11: Perfil de expresión de citocinas secretadas y factores de crecimiento por células mesenquimatosas de la médula ósea

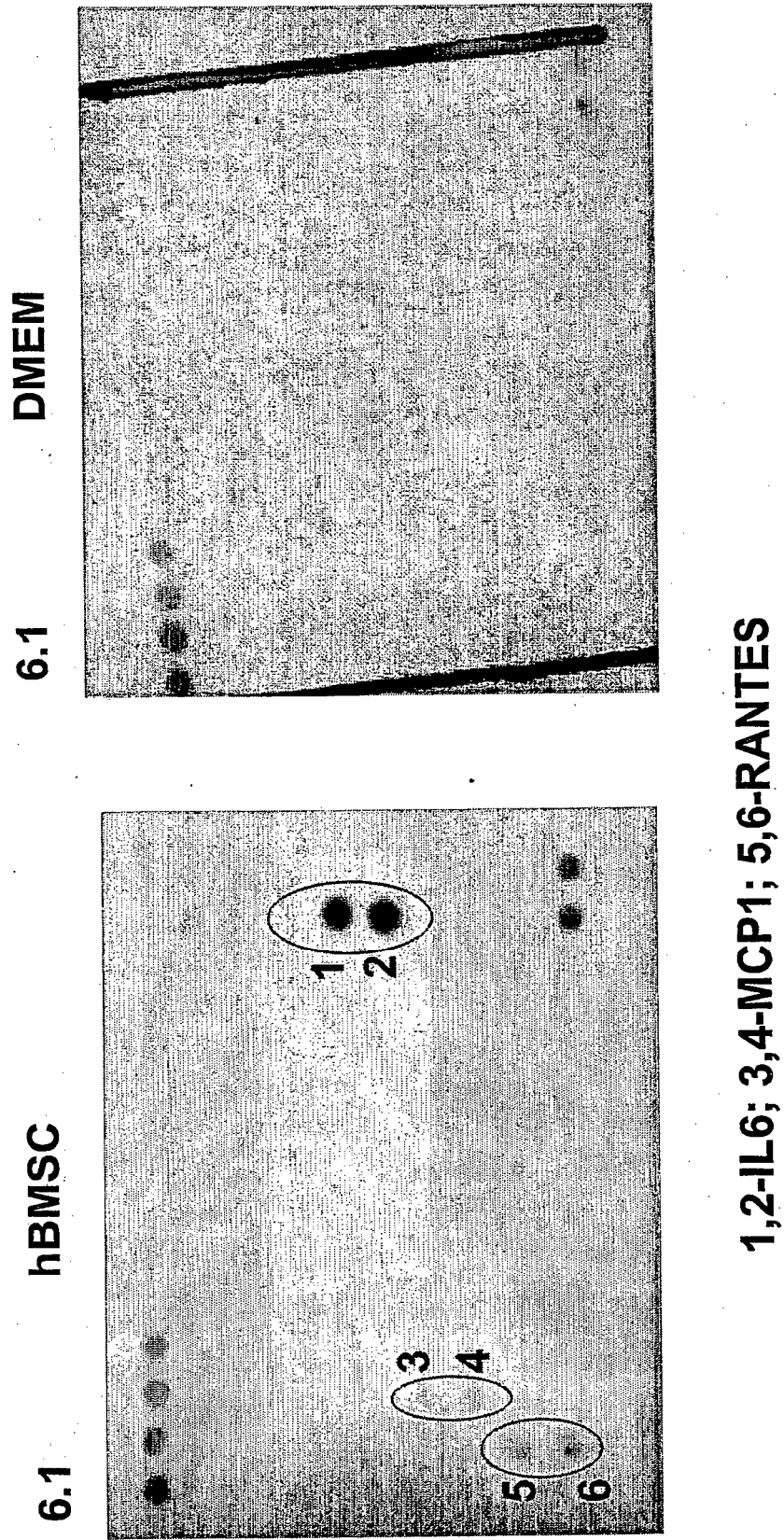
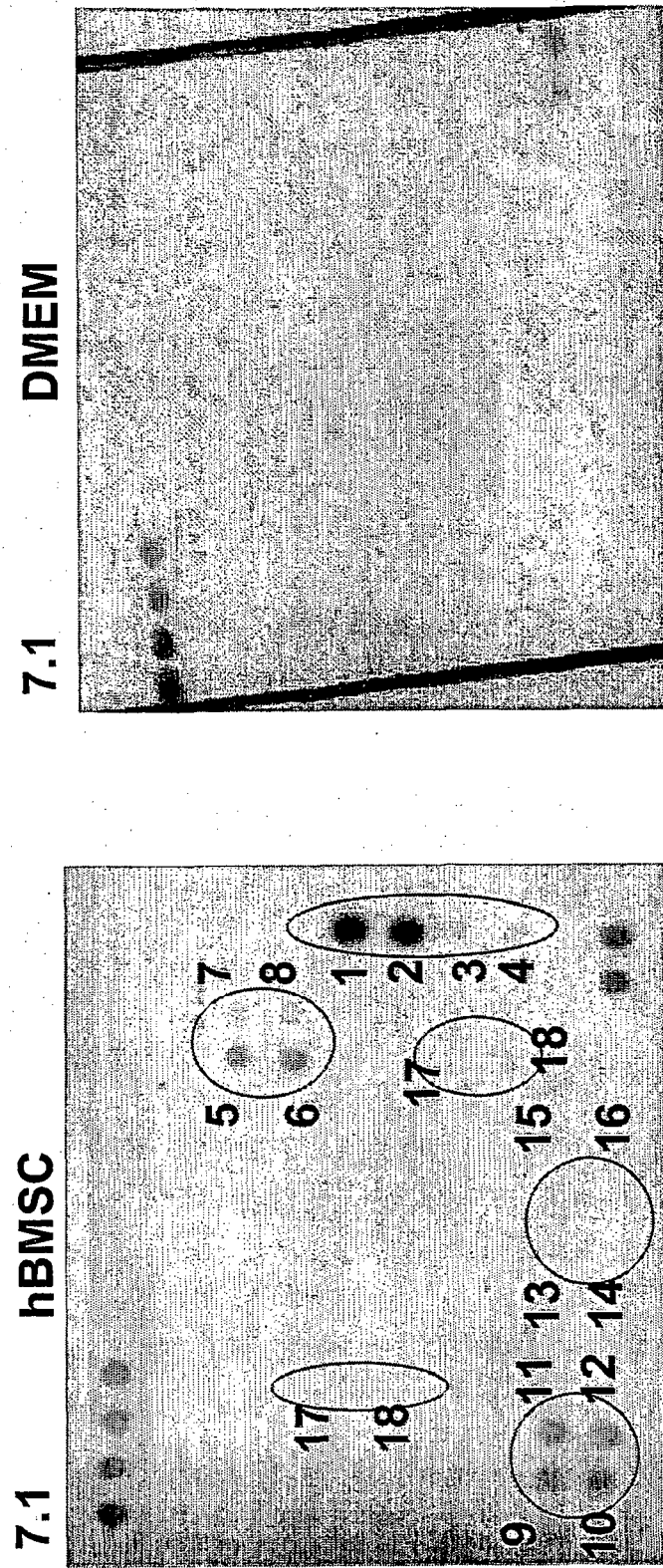
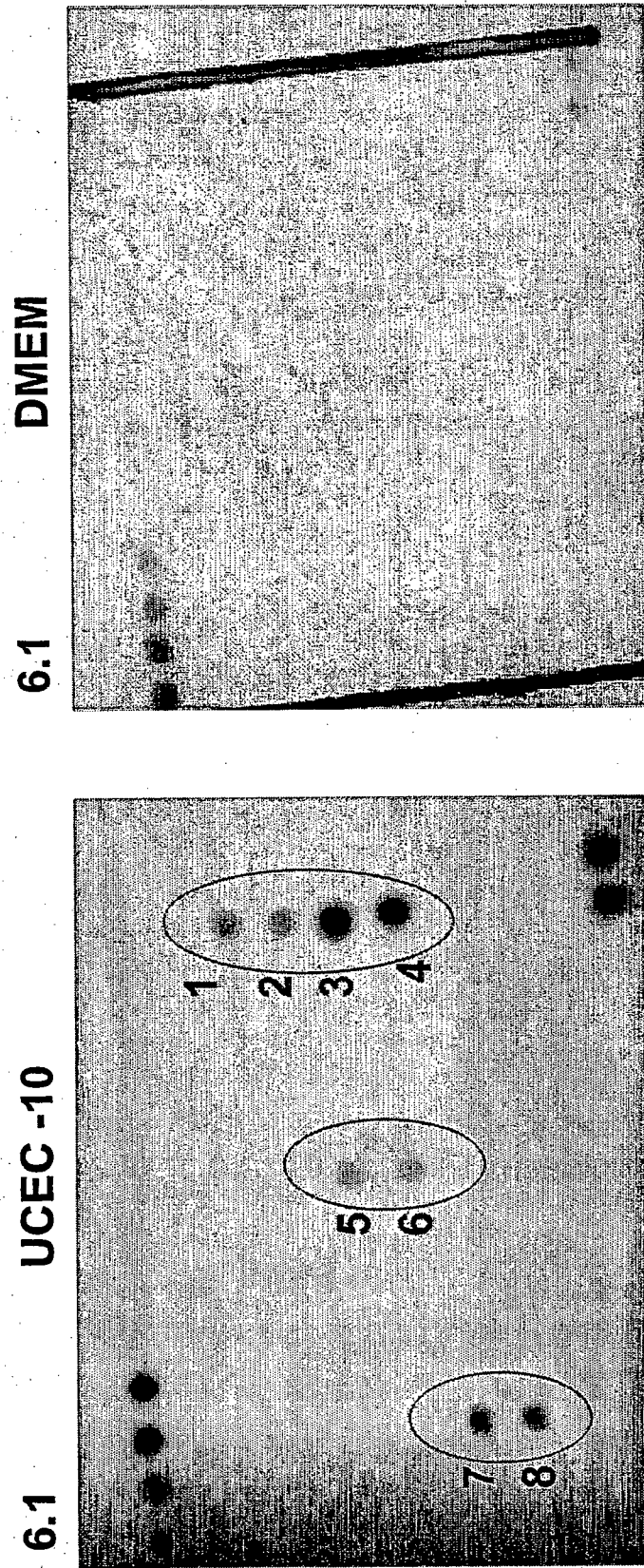


FIGURA 11: Perfil de expresión de citocinas secretadas y factores de crecimiento por células mesenquimatosas de la médula ósea



1,2-IL8; 3,4-sTNFR1; 5,6-GRO; 7,8-GRO-a; 9,10-TIMP1; 11,12-TIMP2
13,14-uPAR; 15,16-VEGF; 17,18-PIGF

FIGURA 12: Perfil de expresión de citocinas y factores de crecimiento secretados por células epiteliales del cordón umbilical



1,2-IGFBP-2; 3,4-IL6; 5,6-IL1R α ; 7,8-MCP-1

FIGURA 12: Perfil de expresión de citocinas y factores de crecimiento secretados por células epiteliales del cordón umbilical

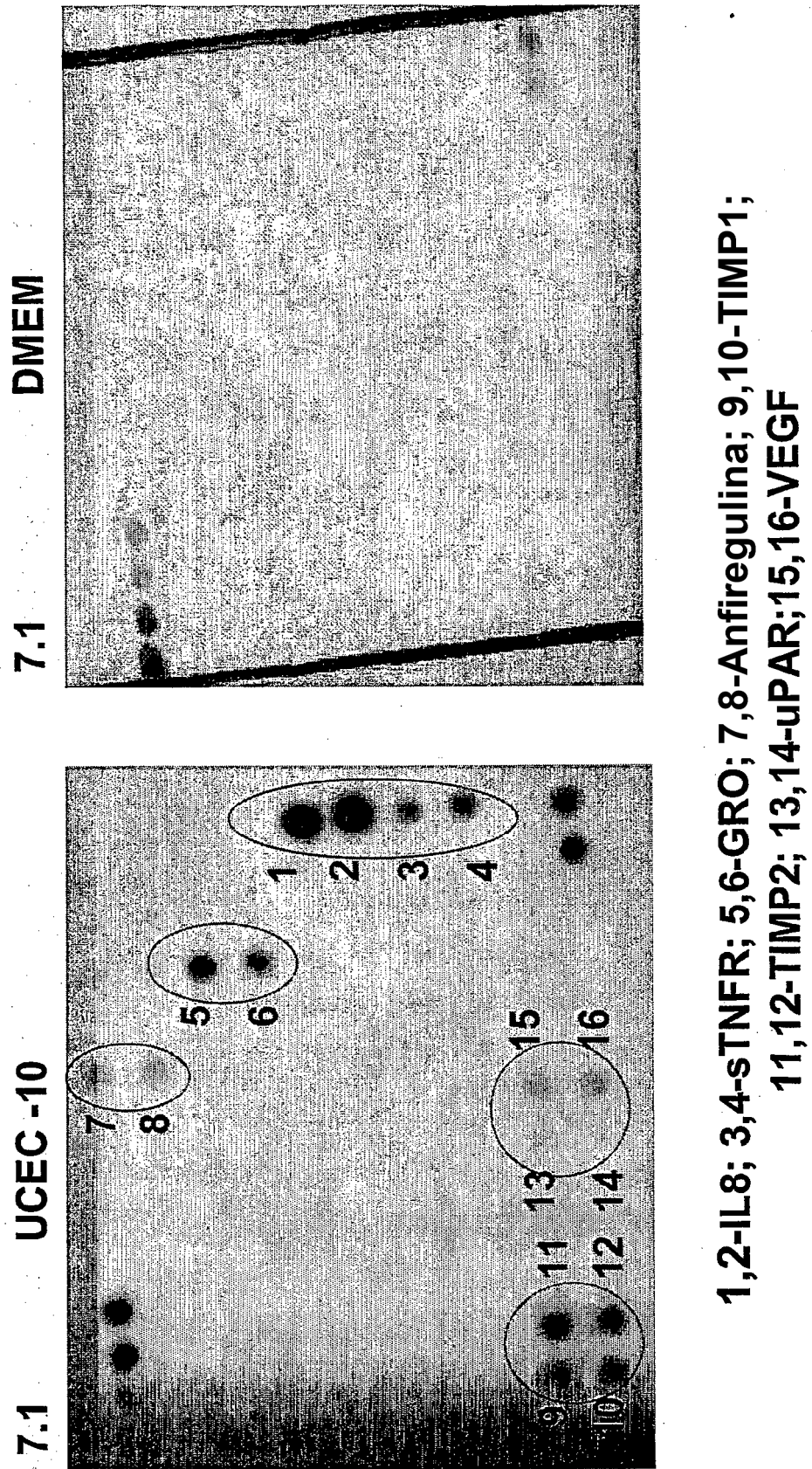
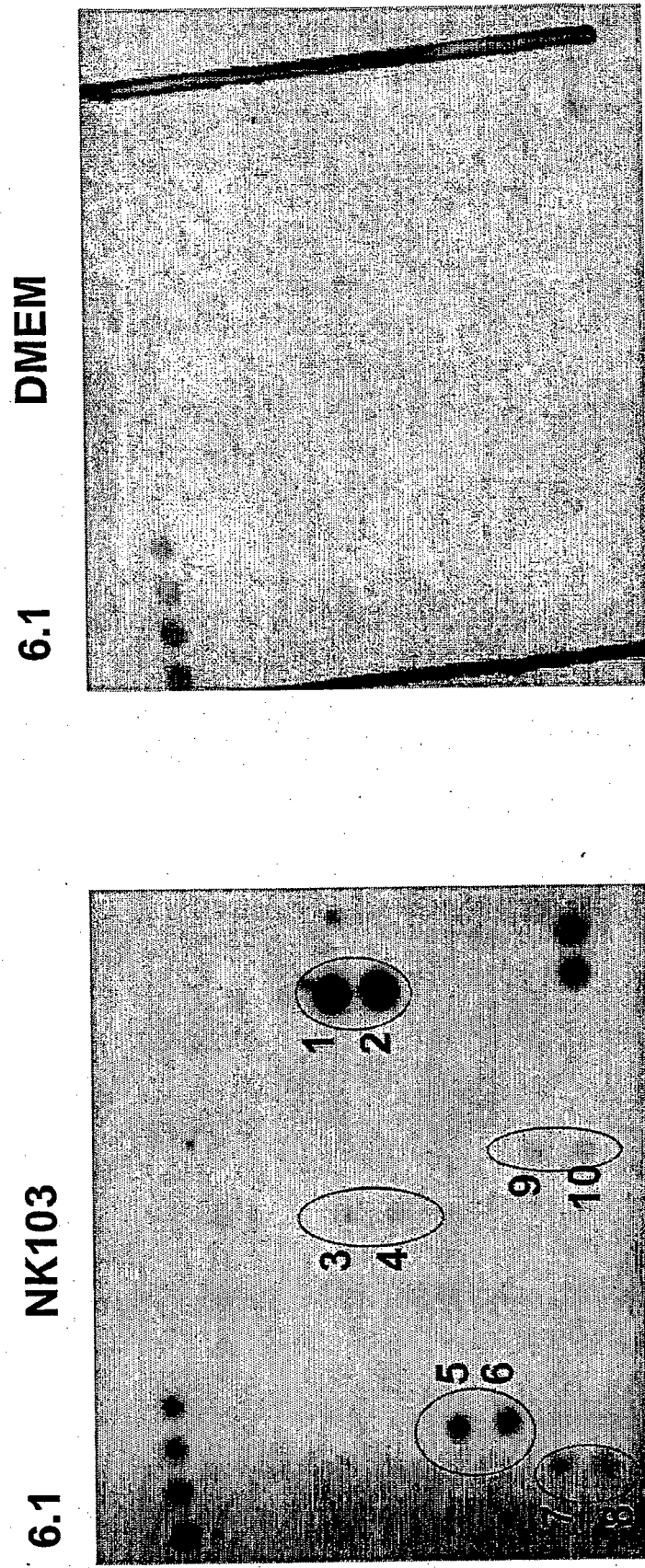


FIGURA 12: Perfil de expresión de citocinas y factores de crecimiento secretados por queratinocitos epidérmicos humanos



1,2-IL6; 3,4-IL1R α ; 5,6-MCP-1; 7,8-RANTES; 9,10-TNF β

FIGURA 12: Perfil de expresión de citocinas y factores de crecimiento secretados por queratinocitos epidérmicos humanos

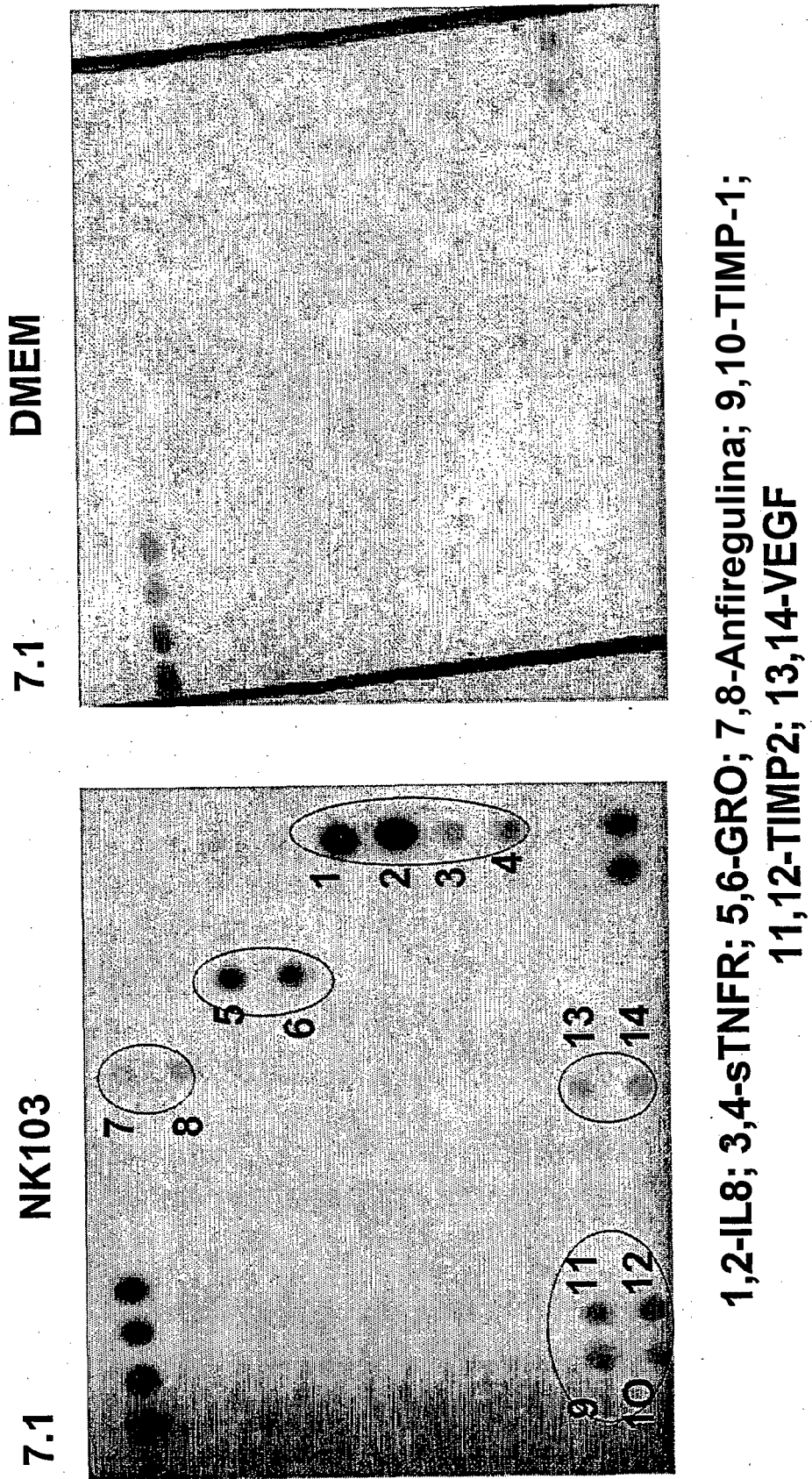


FIGURA 12: Perfil de expresión de citocinas y factores de crecimiento secretados por células epiteliales del cordón umbilical

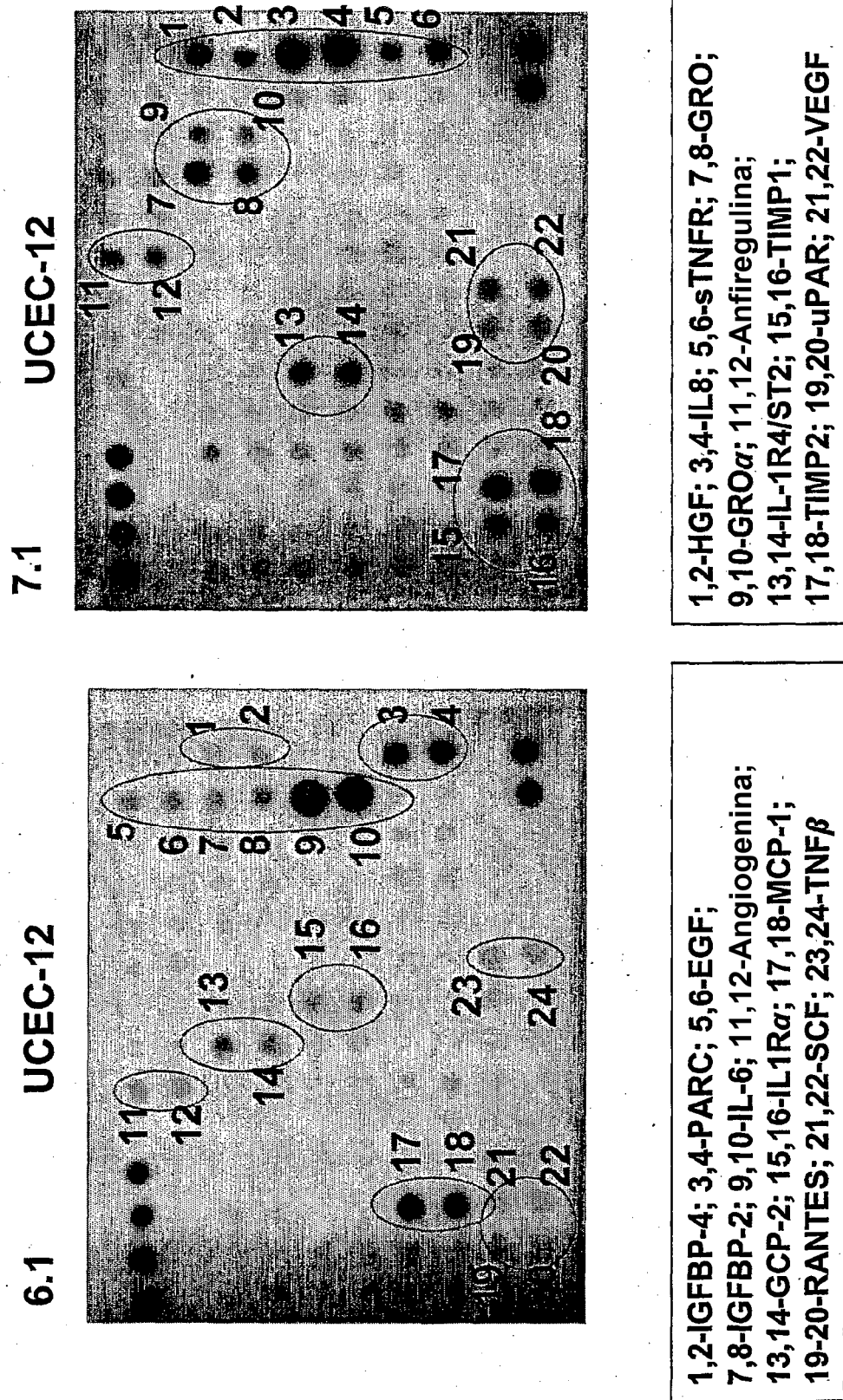


Fig.12

Aplicación en puntos del chip usado para la matriz de citocinas (6.1)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	POS	POS	PO S	PO S	Blanco	Angiog enina	BDN F	BLC	BMP 4	BMP -6	CK b 8-1	CNT F	EGF	Eota xina
2	NEG	NEG	NE G	NE G	Blanco	Angiog enina	BDN F	BLC	BMP 4	BMP -6	CK b 8-1	CNT F	EGF	Eota xina
3	Eotaxi na-2	Eotaxi na-3	FGF -6	FGF -7	Ligando Fit-3	Fractal quina	GCP -2	GD NF	GM- CSF	I-309	IFN-g	IGFB P-1	IGFB P-2	IGFB P-4
4	Eotaxi na-2	Eotaxi na-3	FGF -6	FGF -7	Ligando Fit-3	Fractal quina	GCP -2	GD NF	GM- CSF	I-309	IFN-g	IGFB P-1	IGFB P-2	IGFB P-4
5	IGF-I	IL-10	IL-13	IL-15	IL-16	IL-1a	IL-1b	IL-1ra	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7
6	IGF-I	IL-10	IL-13	IL-15	IL-16	IL-1a	IL-1b	IL-1ra	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7
7	Leptina T	LIGH T	MC P-1	MC P-2	MCP-3	MCP-4	M- CSF	MD C	MIG	MIP- 1 d	MIP- 3a	NAP- 2	NT-3	PAR C
8	Leptina T	LIGH T	MC P-1	MC P-2	MCP-3	MCP-4	M- CSF	MD C	MIG	MIP- 1 d	MIP- 3a	NAP- 2	NT-3	PAR C
9	PDGF -BB	RANT ES	SCF	SDF -1	TARC	TGF- b1	TGF- b3	TNF -a	TNF b	Blan co	Blan co	Blan co	Blan co	Blan co
10	PDGF -BB	RANT ES	SCF	SDF -1	TARC	TGF- b1	TGF- b3	TNF -a	TNF b	Blan co	Blan co	Blan co	POS	POS

Fig.12

Aplicación en puntos del chip usado para la matriz de citocinas (7.1)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	POS	POS	POS	POS	Blanco	Acpr30	AgR P	Angiopo yetina-2	Anfreguli na	Axl	bF GF	b- NGF	BTC	CCL- 28
2	NEG	NEG	NEG	NEG	Blanco	Acpr30	AgR P	Angiopo yetina-2	Anfreguli na	Axl	bF GF	b- NGF	BTC	CCL- 28
3	CTA CK	Dlk	EGF- R	ENA-78	Fas	FGF-4	FGF -9	GCSF	Ligando GITR	GITR	GR O	GR O-a	HCC- 4	HGF
4	CTA CK	Dlk	EGF- R	ENA-78	Fas	FGF-4	FGF -9	GCSF	Ligando GITR	GITR	GR O	GR O-a	HCC- 4	HGF
5	ICA M-1	ICAM-3	IGFB P-3	IGFBP-6	IGF-1 SR	IL-1 R4/ST2	IL-1 RI	IL-11	IL-12 p40	IL-12 p70	IL-17	IL-2 Ra	IL-6 R	IL-8
6	ICA M-1	ICAM-3	IGFB P-3	IGFBP-6	IGF-1 SR	IL-1 R4/ST2	IL-1 RI	IL-11	IL-12 p40	IL-12 p70	IL-17	IL-2 Ra	IL-6 R	IL-8
7	I- TAC	Linfotacti na	MIF	MIP-1a	MIP-1 b	MIP-3b	MS P-a	NT-4	Osteoprot egerina	Oncostat ina M	PIG F	sgp1 30	sTNF RII	sTNF -RI
8	I- TAC	Linfotacti na	MIF	MIP-1a	MIP-1 b	MIP-3b	MS P-a	NT-4	Osteoprot egerina	Oncostat ina M	PIG F	sgp1 30	sTNF RII	sTNF -RI
9	TEC K	TIMP-1	TIMP -2	Trombopo yetina	TRAIL R3	TRAIL R4	uPA R	VEGF	VEGF-D	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
10	TEC K	TIMP-1	TIMP -2	Trombopo yetina	TRAIL R3	TRAIL R4	uPA R	VEGF	VEGF-D	Blanco	Blanco	Blanco	POS	POS

FIGURA 13-1: UCMC-16 cultivadas en DMEM/10 % de STF, en el día 10

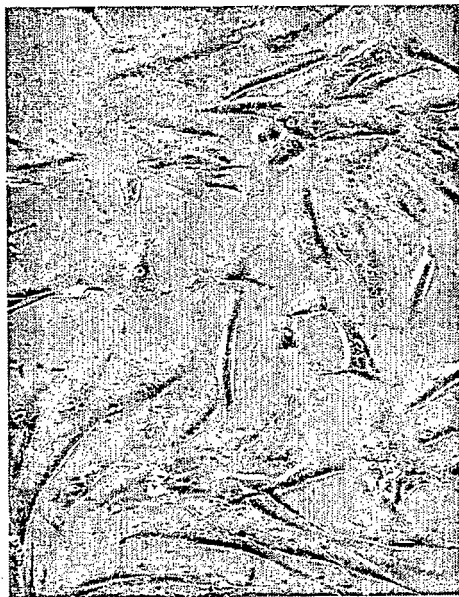


FIGURA 13-2: UCMC-15 cultivadas en medio PTT-1, día 4

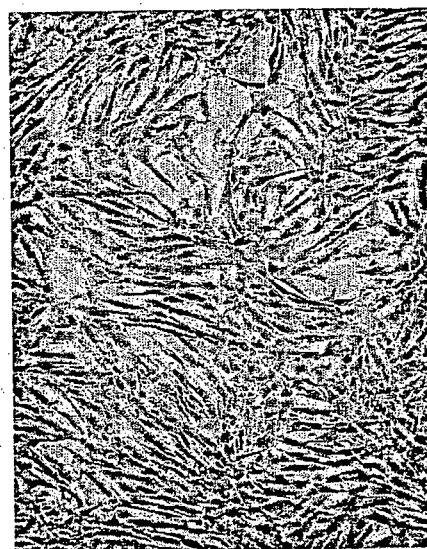
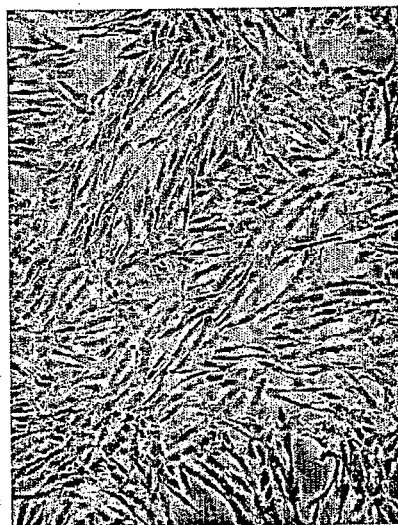
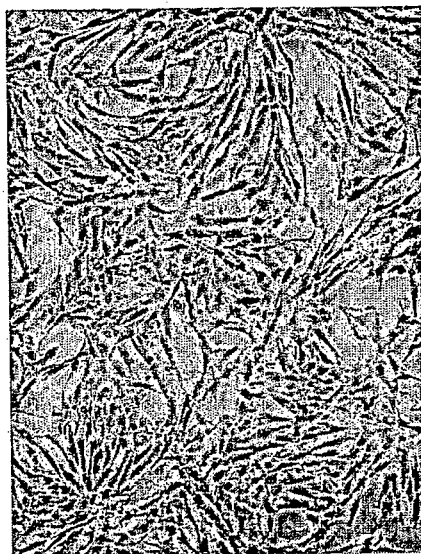


FIGURA 13-3: UCMC-16 cultivadas en PTT-1 en el día 10

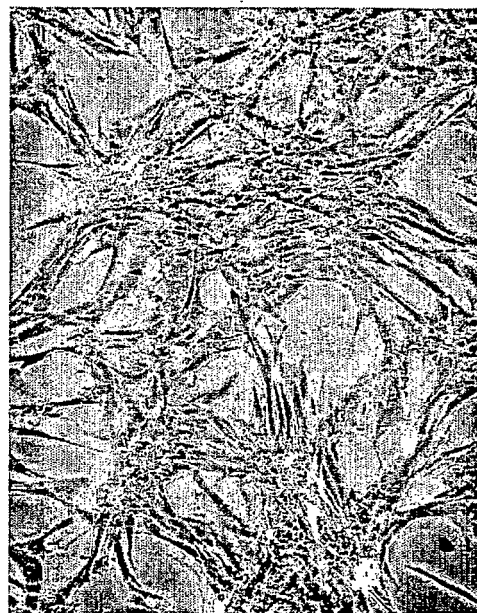
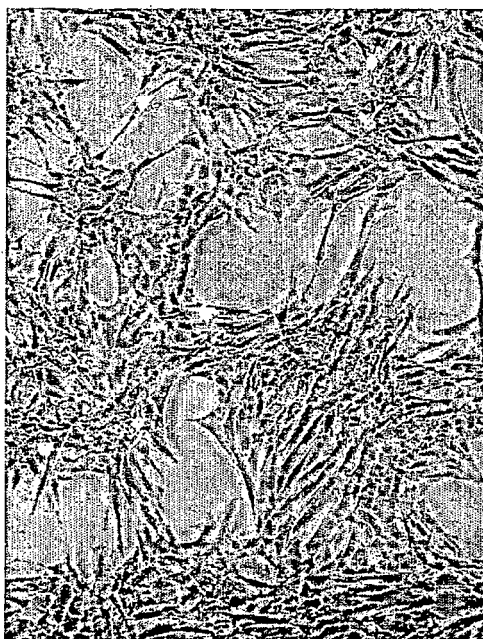
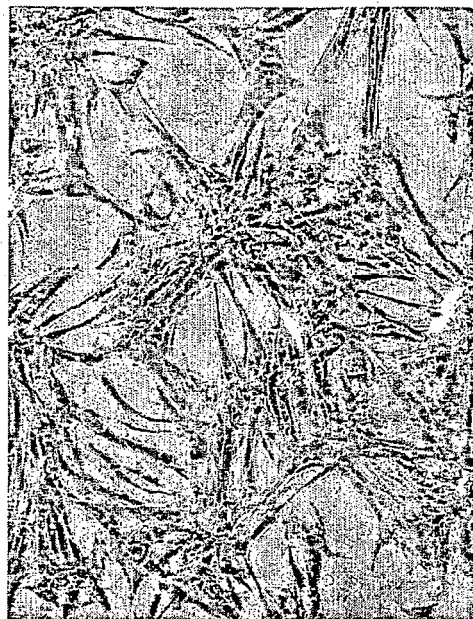


FIGURA 13-4: UCMC-16 cultivadas en PTT-2 en el día 10

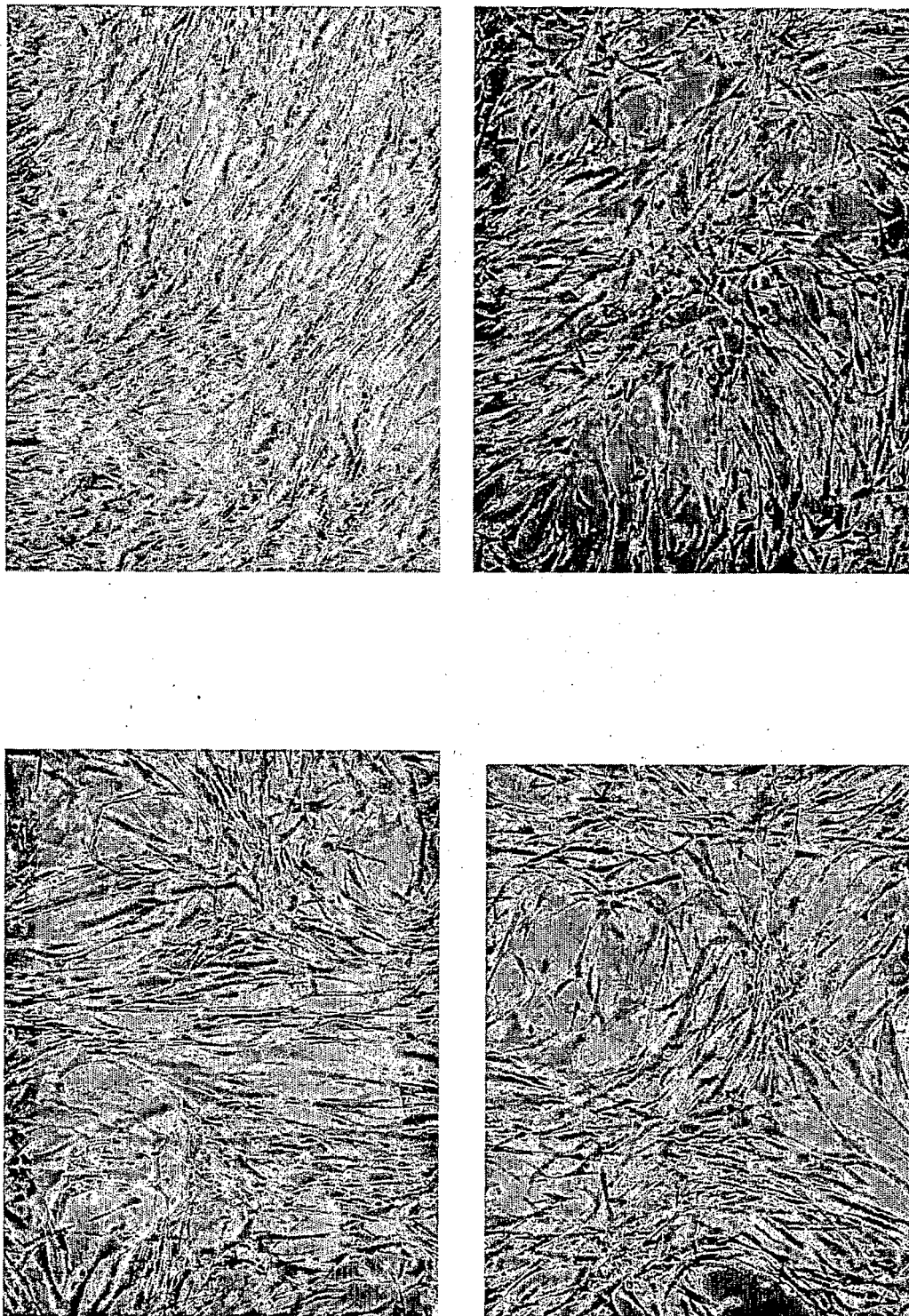


FIGURA 13-5: UCMC-16 cultivadas en PTT-3 en el día 10

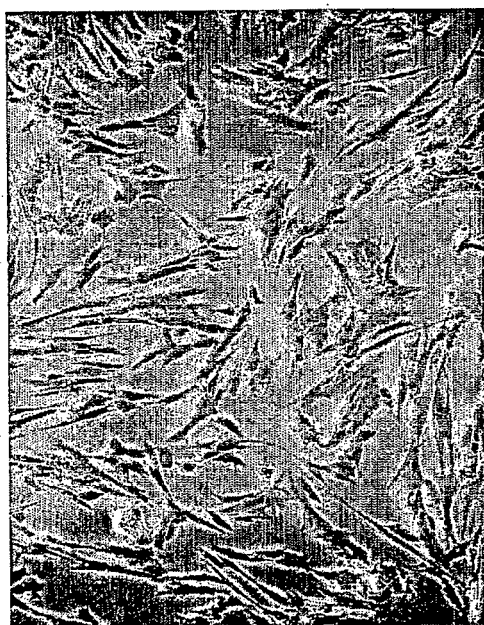
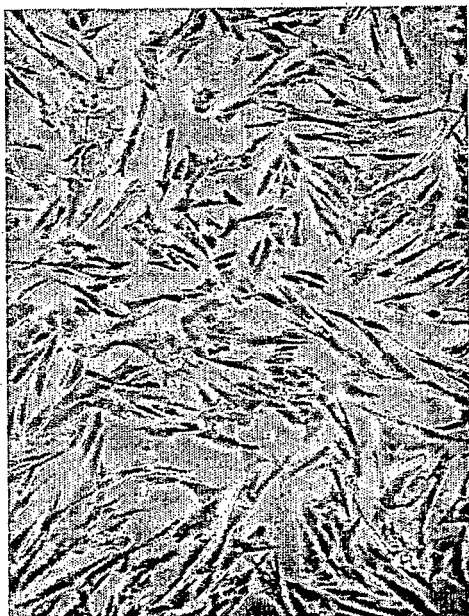


FIGURA 13-6: Células del estroma derivadas de tejido adiposo cultivadas en PTT-3 en el día 10. Las células no crecieron bien en medio libre de suero

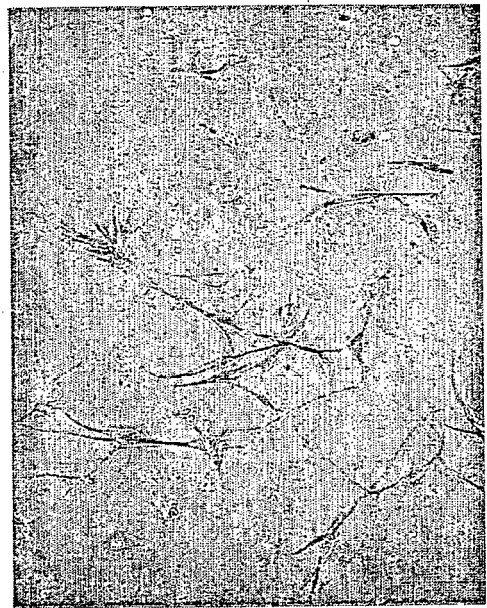
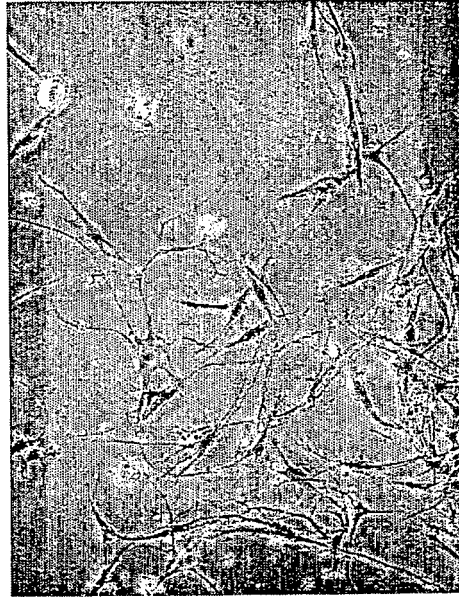
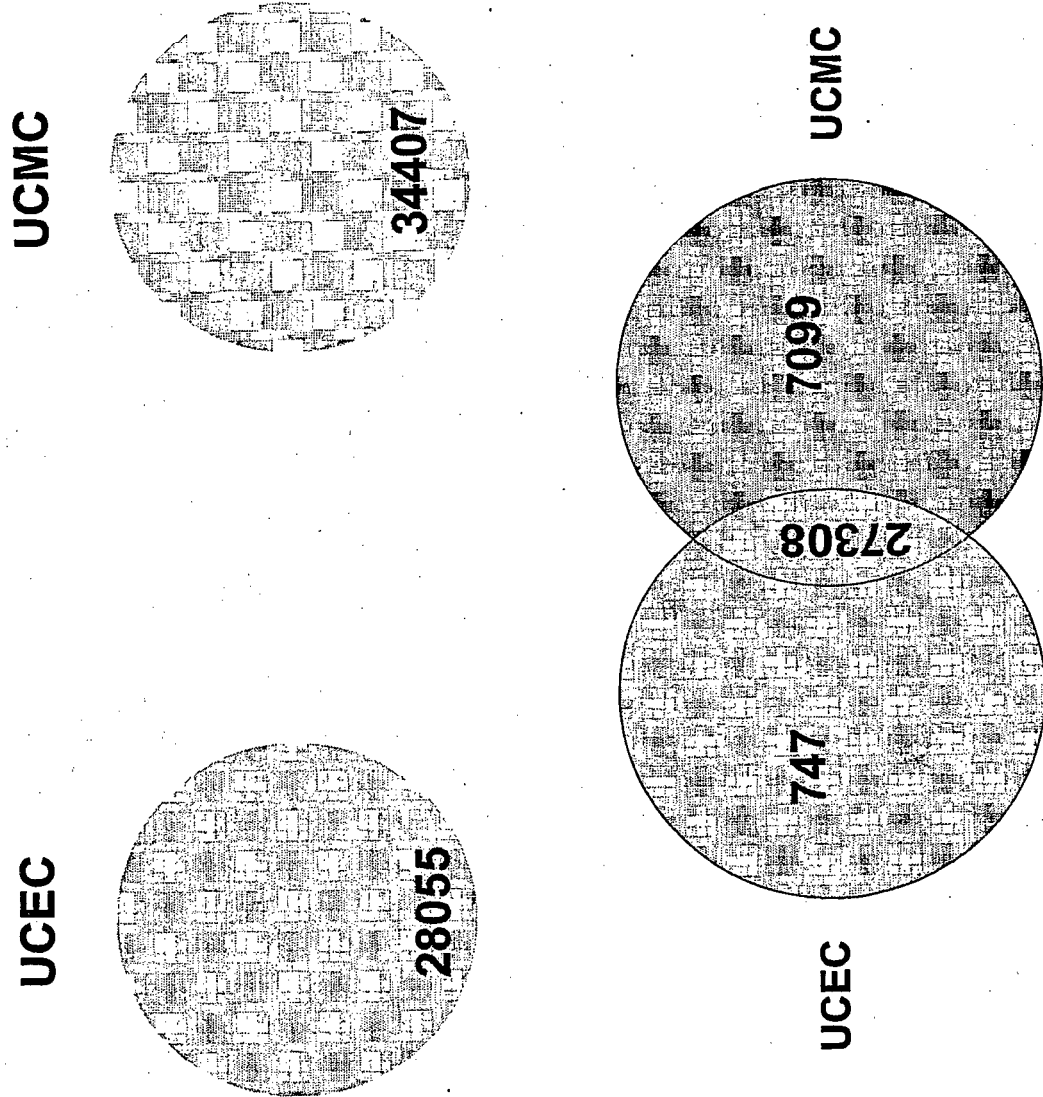


FIGURA 13-7: Células del estroma derivadas de médula ósea cultivadas en PTT-3 (MeE) en el día 10. Las células no crecieron bien en medio libre de suero



FIGURA 14: Expresión génica global en células madre epiteliales y mesenquimatosas del cordón umbilical



**FIGURA 14: Expresión
génica presente en
AMBAS, células
madre epiteliales y
mesenquimatosas del
cordón umbilical**

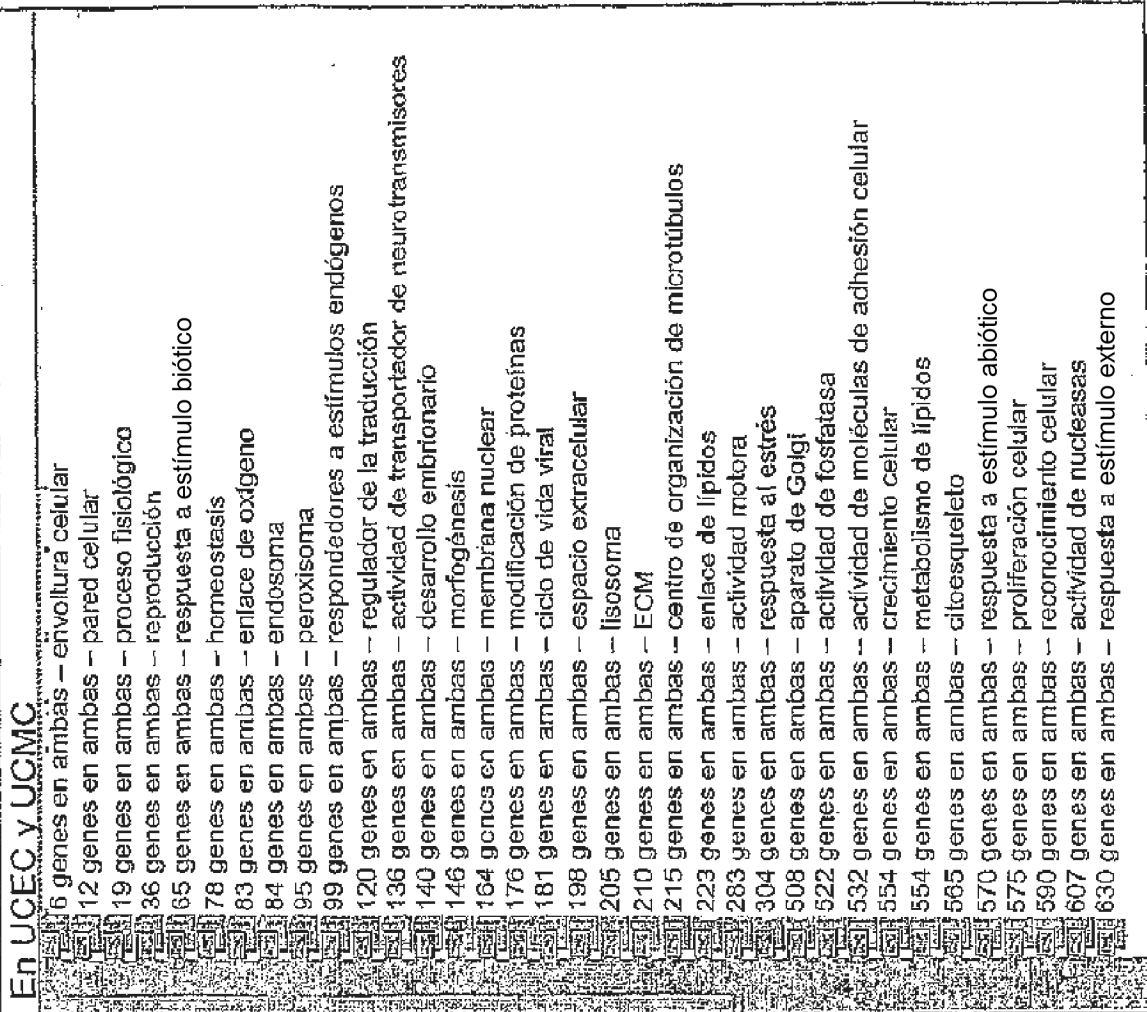
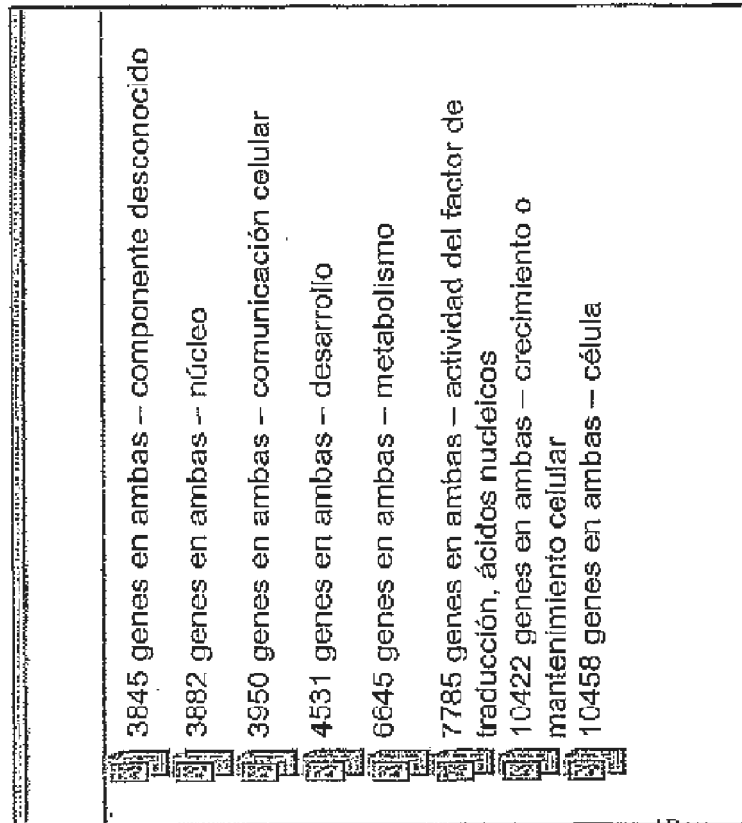
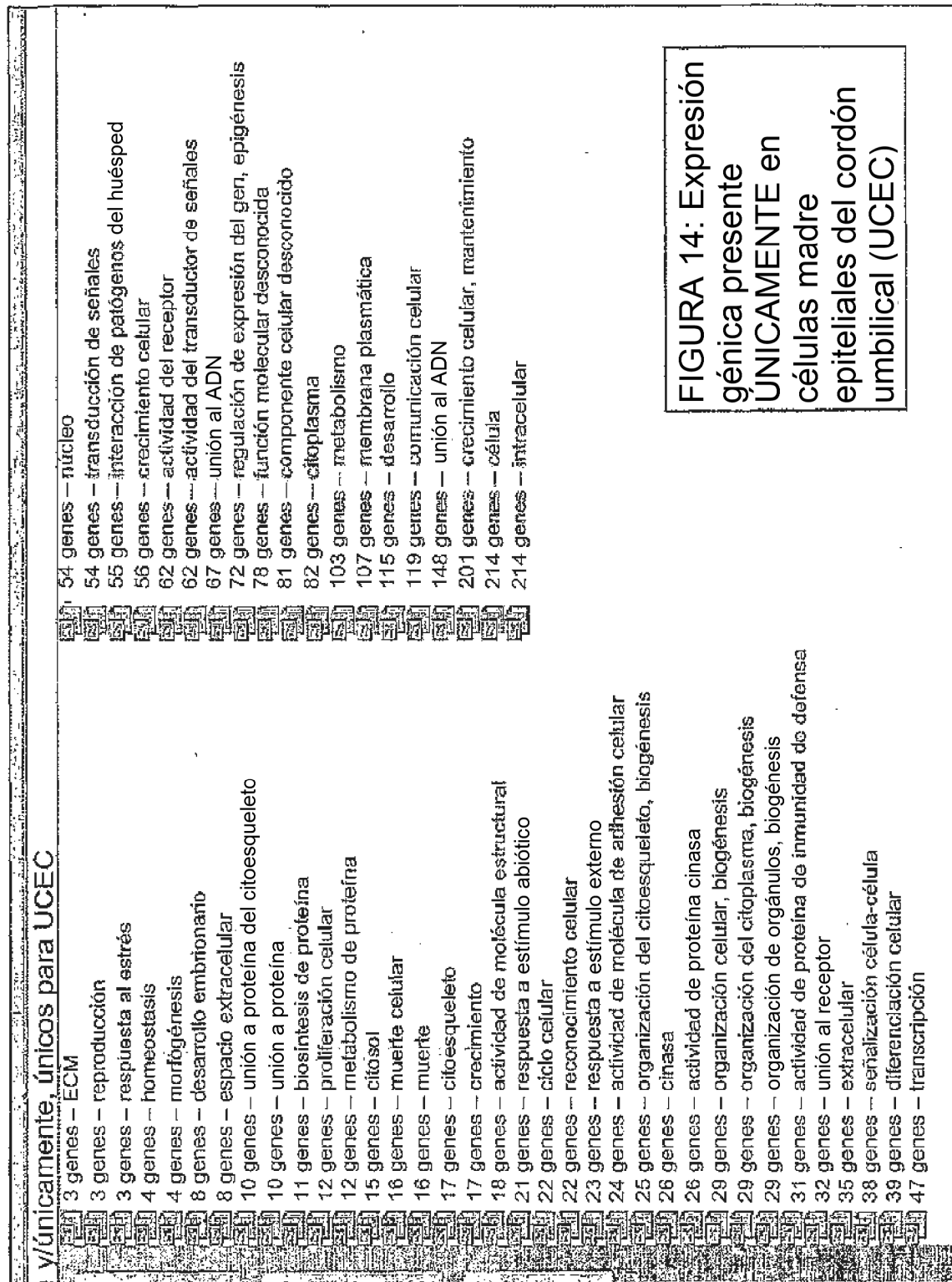


FIGURA 14: Expresión
génica presente en
AMBAS, células
madre epiteliales y
mesenquimatosas del
cordón umbilical

663	genes en ambas – unión a proteínas
666	genes en ambas – muerte celular
747	genes en ambas – actividad de molécula estructural
774	genes en ambas – extracelular
808	genes en ambas – ciclo celular
817	genes en ambas – biosíntesis de proteínas
825	genes en ambas – metabolismo de ADN
899	genes en ambas – ruta de energía
926	genes en ambas – organización del citoesqueleto y biogénesis
975	genes en ambas – unión al receptor
987	genes en ambas – metabolismo de proteínas
1048	genes en ambas – señalización célula-célula
1138	genes en ambas – diferenciación celular
1317	genes en ambas – citosol
1364	genes en ambas – cinasa
1364	genes en ambas – actividad de proteína cinasa
1473	genes en ambas – interacción con patógenos del huésped
1483	genes en ambas – transporte de proteínas
1637	genes en ambas – actividad de canales de iones
1667	genes en ambas – transporte de iones
1774	genes en ambas – organización celular, biogénesis
1774	genes en ambas – biogénesis de la organización de orgánulos
1968	genes en ambas – enlace de nucleótidos
2067	genes en ambas – actividad de receptor
2067	genes en ambas – actividad de transductor de señales
2108	genes en ambas – transducción de señales
2125	genes en ambas – crecimiento celular
2503	genes en ambas – actividad reguladora de la transcripción
2906	genes en ambas – transferasa
2947	genes en ambas – transcripción
3435	genes en ambas – membrana plasmática
3436	genes en ambas – actividad del factor de transcripción
3509	genes en ambas – regulación de expresión del gen
3509	genes en ambas – regulación de expresión del gen, epigénesis
3634	genes en ambas – unión al ADN

FIGURA 14: Expresión
génica presente en
AMBAS, células
madre epiteliales y
mesenquimatosas del
cordón umbilical





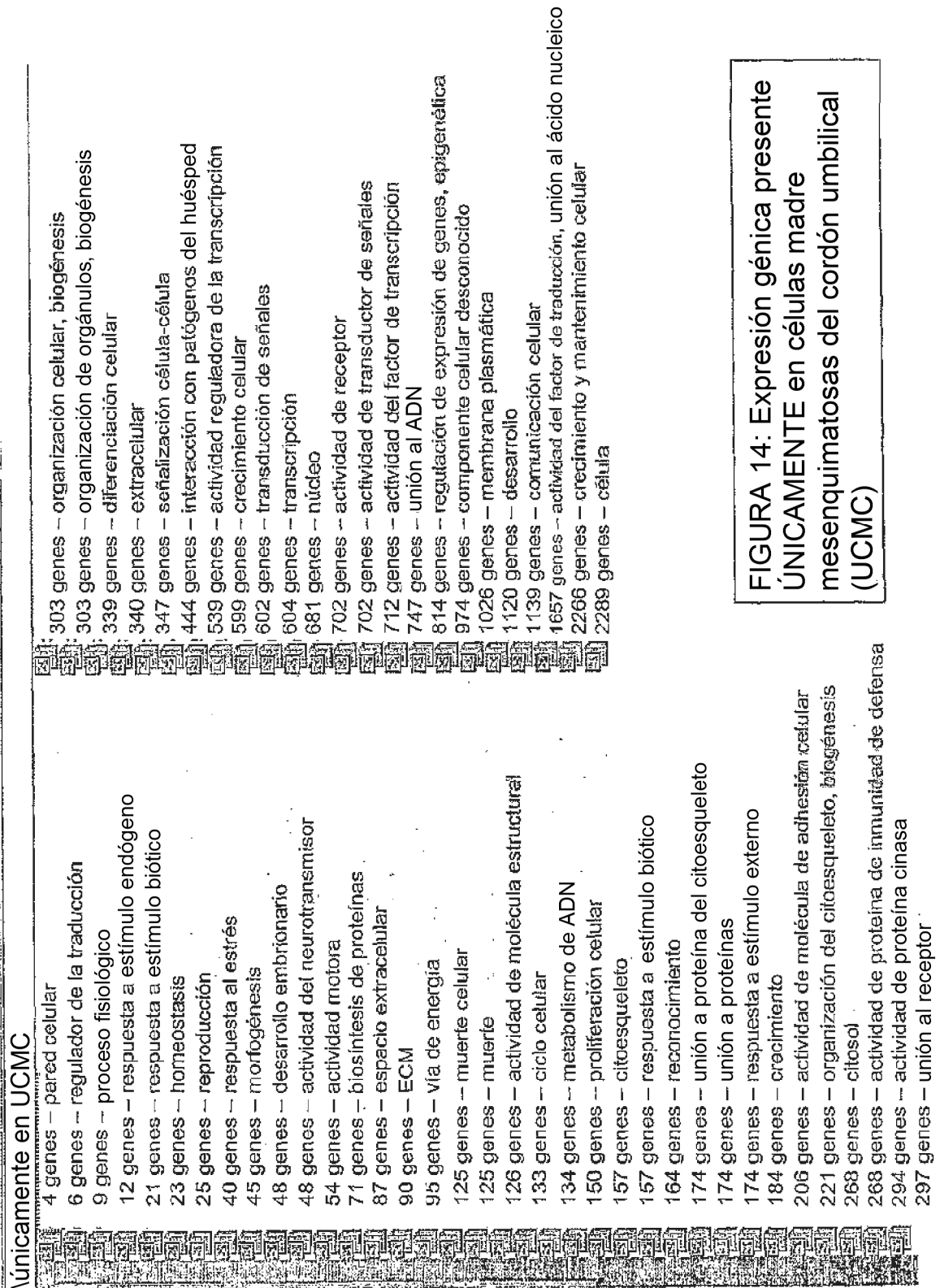


Figura 15

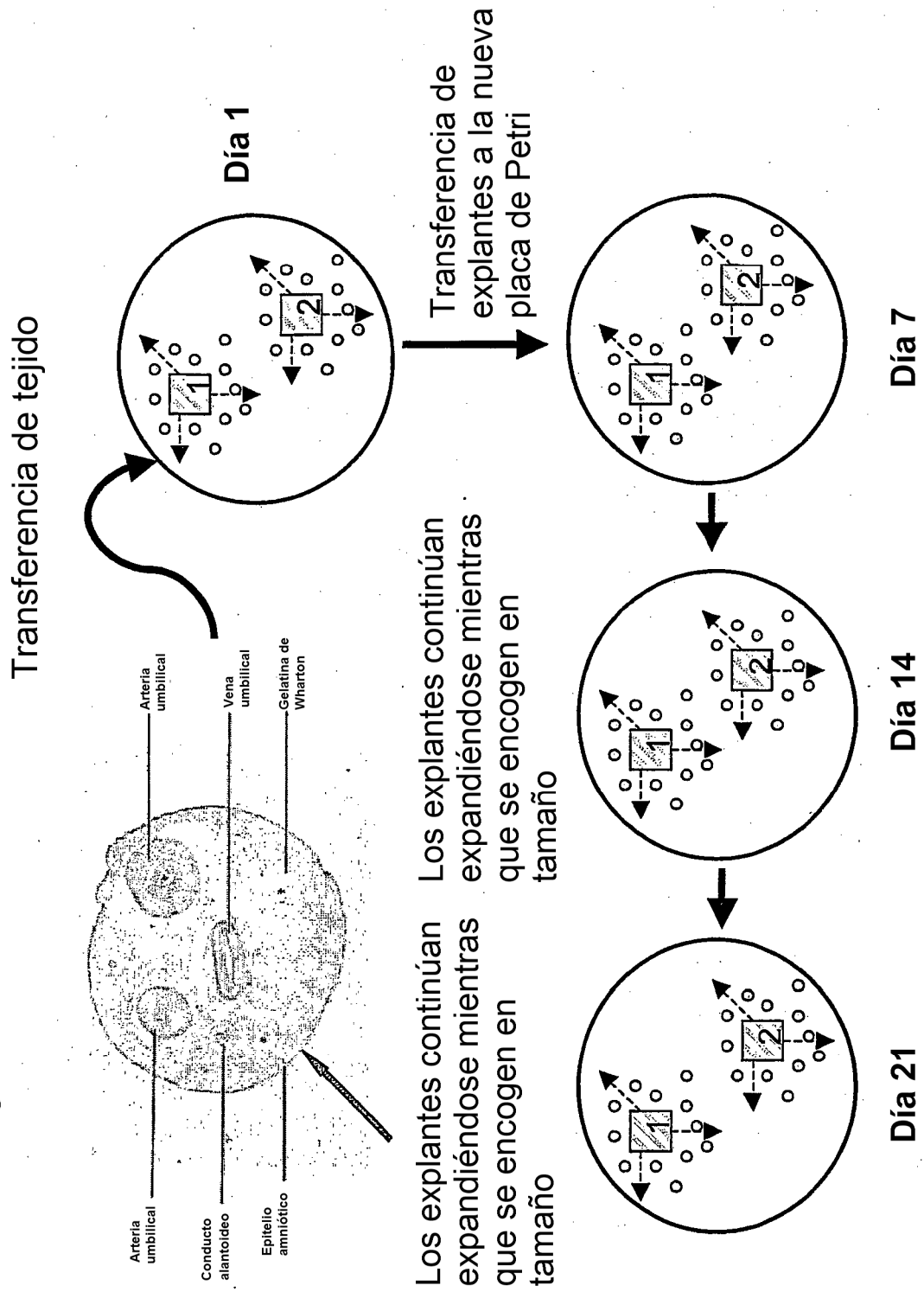


FIGURA 16: Histología de cordón umbilical normal

