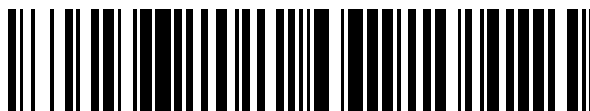


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 928**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0793 (2010.01)

C12N 5/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2011** **E 11795916 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015** **EP 2581443**

54 Título: **Método para diferenciar células progenitoras neurales humanas en neuronas dopaminérgicas, y medio para la diferenciación de las mismas**

30 Prioridad:

14.06.2010 KR 20100055832

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.04.2015

73 Titular/es:

**COLLEGE OF MEDICINE, POCHON CHA
UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC
COOPERATION FOUNDATION (100.0%)
198-1 Donggyo-dong Pochon-siu
Gyeonggi-do 487-800, KR**

72 Inventor/es:

MOON, JI-SOOK

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 532 928 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para diferenciar células progenitoras neurales humanas en neuronas dopaminérgicas, y medio para la diferenciación de las mismas

Campo técnico

La presente invención se refiere a un método para diferenciar células progenitoras neurales humanas en neuronas dopaminérgicas. Más específicamente, la presente invención se refiere a un método para diferenciar células progenitoras neurales humanas en neuronas dopaminérgicas, que comprende cultivar células progenitoras neurales humanas en un medio que comprende ácido fusárico. Además, la presente invención se refiere a un medio para diferenciar células progenitoras neurales humanas en neuronas dopaminérgicas.

Técnica antecedente

La enfermedad de Parkinson se caracteriza por la degeneración selectiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra del mesencéfalo. Se están estudiando de forma variada terapias que usan reemplazo de neuronas dopaminérgicas en pacientes con enfermedad de Parkinson a través del trasplante de tejido mesencefálico fetal (véase la Referencia 1). Los injertos de tejido mesencefálico fetal pueden sobrevivir durante un largo periodo en el cerebro humano, restaurar la inervación dopaminérgica al estriado en pacientes y reducir los síntomas motores con enfermedad de Parkinson (véase la Referencia 2).

Aunque el trasplante es un tratamiento prometedor para enfermedad de Parkinson, su aplicación clínica se ha limitado a unos pocos casos, porque es muy difícil obtener grandes cantidades de tejidos fetales abortivos humanos. Para superar este problema, se han investigado diversas células candidatas como posibles células donantes para terapia de trasplante para enfermedad de Parkinson (véase la Referencia 3).

Mientras tanto, parece que las células progenitoras neurales humanas (hNPC) derivadas de tejido mesencefálico fetal son una buena fuente celular candidata para trasplante a causa de su capacidad de auto-renovación para actividad de proliferación a largo plazo y de diferenciación en neuronas dopaminérgicas (véanse las Referencias 4 y 5). Por lo tanto, para tratar la enfermedad de Parkinson a través del reemplazo de neuronas dopaminérgicas (es decir, trasplante), es muy importante establecer un método eficaz para la proliferación y expansión de hNPC y un método eficaz para la diferenciación de hNPC en neuronas dopaminérgicas.

Los métodos para la diferenciación de hNPC en neuronas dopaminérgicas conocidos en las técnicas previas incluyen un método de diferenciación en un medio que contiene ácido ascórbico y dibutiril cíclico adenosina monofosfato (db-AMPC) durante 3 días (véase la Referencia 6); un método de diferenciación en un medio que contiene BDNF (factor neurotrófico derivado de cerebro), dopamina, y forskolina durante 3 semanas (véase la Referencia 7); y un método de diferenciación en un medio que contiene SHH (sonic hedgehog), FGF-8 (factor-8 de crecimiento de fibroblastos), BDNF (factor neurotrófico derivado de cerebro), y ácido ascórbico durante 3 semanas (véase la Referencia 8).

Sin embargo, los métodos de diferenciación de acuerdo con las técnicas previas no muestran potencial satisfactorio de diferenciación; y requieren mucho tiempo para diferenciación. Y además, se incurre en problemas económicos a partir del uso de un medio que contiene excipientes caros, tales como SHH, FGF-8, etc. La tecnología para la proliferación de una gran cantidad de células necesaria para tratar a los pacientes que padecen enfermedad de Parkinson aún es insuficiente. Por lo tanto, aún siguen existiendo muchas limitaciones en las aplicaciones clínicas de los mismos.

Descripción

Problema técnico

La presente invención proporciona un método para diferenciar células progenitoras neurales humanas (hNPC) en neuronas dopaminérgicas, en alto potencial de diferenciación; y un medio útil para la diferenciación. Especialmente, la presente invención proporciona un método para diferenciar hNPC en neuronas dopaminérgicas usando ácido fusárico como agente inductor de diferenciación; y un medio útil para la diferenciación.

Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar un método para diferenciar células progenitoras neurales humanas en neuronas dopaminérgicas y un medio que comprende un nuevo agente inductor de diferenciación.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un medio de diferenciación útil para diferenciar células progenitoras neurales humanas en neuronas dopaminérgicas.

Solución técnica

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para diferenciar células progenitoras neurales humanas en neuronas dopaminérgicas, que comprende cultivar células progenitoras neurales humanas en un medio que comprende ácido fusárico.

En el método de la presente invención, el medio puede prepararse añadiendo ácido fusárico a un medio para diferenciación dopaminérgica que comprende dibutilil cíclico adenosina monofosfato (db-AMPC), forskolina, B27, sonic hedgehog (SHH), y factor-8 de crecimiento de fibroblastos (FGF8).

Como alternativa, en el método de la presente invención, el medio puede ser un medio NB que comprende ácido fusárico, db-AMPC, forskolina, y B27, preferiblemente un medio NB que comprende de 50 μ M a 4 mM de ácido fusárico, de 50 μ M a 4 mM de db-AMPC, de 5 μ M a 20 μ M de forskolina, y del 0,5 % p/p al 5 % p/p de B27. Más preferiblemente, el medio puede ser un medio NB que comprende 100 μ M de ácido fusárico, 100 μ M de db-AMPC, 100 μ M de forskolina, y el 2 % p/p de B27.

En el método de la presente invención, el cultivo puede realizarse en condiciones de hipoxia que tiene del 2 % al 10 % de presión parcial de oxígeno.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un medio para diferenciar células progenitoras neurales humanas en neuronas dopaminérgicas, cuyo medio es un medio NB que comprende ácido fusárico, db-AMPC, forskolina, y B27.

El medio puede ser un medio NB que comprende de 50 μ M a 4 mM de ácido fusárico, de 50 μ M a 4 mM de db-AMPC, de 5 μ M a 20 μ M de forskolina, y del 0,5 % p/p al 5 % p/p de B27, preferiblemente un medio NB que comprende 100 μ M de ácido fusárico, 100 μ M de db-AMPC, 100 μ M de forskolina, y el 2 % p/p de B27.

Efectos ventajosos

Se descubre mediante la presente invención que, cuando se cultivan células progenitoras neurales humanas en presencia de ácido fusárico, la diferenciación en neuronas dopaminérgicas está remarcadamente aumentada. Especialmente, el método de diferenciación de la presente invención es rentable, porque las células progenitoras neurales humanas pueden diferenciarse en neuronas dopaminérgicas usando ácido fusárico barato, en lugar de los agentes inductores de diferenciación caros; SHH y FGF8, que son de uso limitado. Y además, el método de diferenciación de la presente invención puede mejorar de forma remarcable el potencial de diferenciación insatisfactorio de acuerdo con los métodos de la técnica previa. Por lo tanto, el método de diferenciación de la presente invención puede aplicarse a la fabricación de neuronas dopaminérgicas para tratar daños neuronales incluyendo enfermedad de Parkinson.

Descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra los resultados obtenidos por recuento de TH y Tuj1 a través de tinción DAPI, después de inducción de la diferenciación en neuronas dopaminérgicas usando diversos medios.

La FIG. 2 muestra los resultados obtenidos midiendo los niveles de expresión de TH y Tuj1, después de proliferación de hNPC, seguido por inducción de la diferenciación en neuronas en medios con o sin ácido fusárico 100 μ M.

La FIG. 3 muestra los resultados obtenidos realizando inmunocitoquímica y análisis de RT-PCR, después de proliferación de hNPC, seguido por inducción de la diferenciación en neuronas en medios con o sin ácido fusárico 100 μ M.

La FIG. 4 muestra los resultados obtenidos midiendo los niveles de expresión de TH en las células, después de inducción de la diferenciación en células dopaminérgicas usando medios con diferentes agentes inductores de la diferenciación.

La FIG. 5 muestra los resultados obtenidos midiendo los potenciales de diferenciación en hipoxia y en normoxia, respectivamente.

La FIG. 6 muestra los resultados obtenidos midiendo los efectos de ácido fusárico, cuando se indujo diferenciación en presencia de MPP.

La FIG. 7 muestra los resultados obtenidos midiendo los niveles de expresión de TH y Tuj1, después de proliferación y subcultivo de hNPC, seguido por inducción de la diferenciación de las hNPC en pase temprano (pase 7), pase intermedio (pase 11), y pase tardío (pase 17).

La FIG. 8 muestra los resultados obtenidos midiendo los niveles de expresión de TH en las células respectivas a través de inmunocitoquímica, después de proliferación y subcultivo de hNPC, seguido por inducción de la diferenciación de las hNPC en pase temprano (pase 7), pase intermedio (pase 11), y pase tardío (pase 17).

La FIG. 9 muestra los resultados obtenidos midiendo los niveles de expresión de nestina (un marcador de células madre neurales), Ki67 (un marcador de células proliferativas), Tuj1 (un marcador neuronal) en las células respectivas a través de inmunocitoquímica, después de proliferación y subcultivo de hNPC, seguido por

inducción de la diferenciación de las respectivas hNPC en fase en fase prematuro (fase 7), fase intermedio (fase 11), y fase tardío (fase 17).

La FIG. 10 muestra los resultados obtenidos realizando análisis FACS en las hNPC en fase prematuro (fase 7), antes y después de la diferenciación durante 7 días.

La FIG. 11 muestra los resultados obtenidos realizando RT-PCR y análisis de transferencia de Western sobre las células resultantes, después de proliferación y subcultivo de hNPC, seguido por inducción de la diferenciación de las respectivas hNPC en fase en fase prematuro (fase 7), fase intermedio (fase 11), y fase tardío (fase 17).

La FIG. 12 muestra los resultados obtenidos caracterizando las células diferenciadas de acuerdo con el método de diferenciación de la presente invención, a través de inmunocitoquímica.

La FIG. 13 muestra los resultados obtenidos caracterizando las células diferenciadas de acuerdo con el método de diferenciación de la presente invención, a través de RT-PCR y análisis de transferencia de Western, e inmunocitoquímica.

La FIG. 14 muestra los resultados obtenidos midiendo las expresiones de otros subtipos de neuronas, es decir, glutamato, GABA, ChAT y serotonina a través de inmunocitoquímica, cuando se indujo diferenciación de acuerdo con el método de diferenciación de la presente invención.

Mejor modo

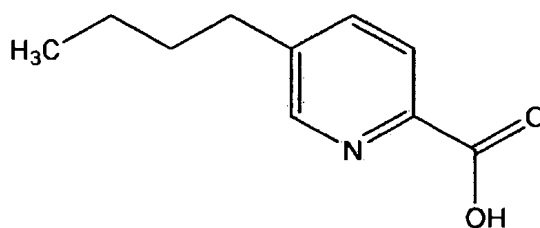
La presente invención proporciona un método para diferenciar células progenitoras neurales humanas en neuronas dopaminérgicas, que comprende cultivar células progenitoras neurales humanas en un medio que comprende ácido fusárico.

Las células progenitoras neurales humanas pueden obtenerse de acuerdo con métodos presentados previamente, por ejemplo el método descrito en Storch et al. 2001; y Milosevic et al. 2006, 2007. Como se usa en este documento, la expresión "células progenitoras neurales humanas" se refiere a las células *ex vivo* separadas del cuerpo humano, es decir, las células progenitoras neurales humanas que están proliferando de acuerdo con métodos de cultivo celular convencional después de su separación del cuerpo humano. Las células progenitoras neurales humanas tienen pluripotencia, y pueden diferenciarse en neuronas, astrocitos, oligodendrocitos, etc.

El método de diferenciación de la presente invención se realiza usando un medio que comprende ácido fusárico como agente inductor de la diferenciación.

El ácido fusárico, cuyo nombre químico es ácido 5-butilpicolínico, tiene la siguiente estructura química de Fórmula 1. El ácido fusárico, que es un compuesto conocido, puede prepararse de acuerdo con métodos conocidos o está disponible en el mercado (por ejemplo, Sigma-Aldrich, etc.).

<Fórmula 1>



En el método de diferenciación de la presente invención, el medio puede prepararse añadiendo ácido fusárico a un medio de la técnica previa para diferenciación dopaminérgica. Por ejemplo, el medio puede prepararse añadiendo ácido fusárico a un medio de la técnica previa para diferenciación dopaminérgica que comprende dibutilil cíclico adenosina monofosfato (db-AMPC), forskolina, B27, SHH (sonic hedgehog) y FGF8 (factor de crecimiento de fibroblastos 8). En ese momento, puede añadirse ácido fusárico en una concentración de 50 μ M a 4 mM. El db-AMPC, forskolina, B27, SHH, y FGF8, que se usan convencionalmente en la técnica, están disponibles en el mercado. Por ejemplo, el db-AMPC y forskolina pueden adquirirse de Sigma; B27 puede adquirirse de GIBCO (marca registrada: suplemento B-27 sin AO); SHH y FGF8 pueden adquirirse de R&D system y PeproTech, respectivamente. En una realización, el medio preparado añadiendo ácido fusárico a un medio de la técnica previa para diferenciación dopaminérgica puede ser un medio NB (medio neurobasal) que comprende de 50 μ M a 4 mM de db-AMPC, 5 μ M a 20 μ M de forskolina, del 0,5 % al 5 % de B27, de 25 ng/ml a 500 ng/ml de SHH, de 10 ng/ml a 200 ng/ml de FGF8, y de 50 μ M a 4 mM de ácido fusárico. El medio basal, es decir, el medio NB puede adquirirse, por ejemplo, de Invitrogen.

Preferiblemente, el medio usado en el método de diferenciación de la presente invención puede ser un medio que reemplaza el SHH y FGF8 caros que son de uso limitado. Sorprendentemente, se descubre por la presente invención que el medio que contiene solamente ácido fusárico sin SHH y FGF8 muestra mayor potencial de diferenciación en neuronas dopaminérgicas que el medio que contiene todos los componentes, es decir, SHH, FGF8, y ácido fusárico.

Por lo tanto, en el método de diferenciación de la presente invención, el medio puede ser un medio NB que comprende ácido fusárico, db-AMPC, forskolina, y B27, preferiblemente un medio NB que comprende de 50 μ M a 4 mM de ácido fusárico, de 50 μ M a 4 mM de db-AMPC, de 5 μ M a 20 mM de forskolina, y del 0,5 % p/p al 5 % p/p de B27. Más preferiblemente, el medio puede ser un medio NB que comprende de 50 μ M a 1 mM de ácido fusárico, de 50 μ M a 1 mM de db-AMPC, de 5 μ M to 15 μ M de forskolina, y del 0,5 % p/p al 3 % p/p de B27. En una realización, el medio puede ser un medio NB que comprende aproximadamente 100 μ M de ácido fusárico, aproximadamente 100 μ M de db-AMPC, aproximadamente 10 μ M de forskolina, y aproximadamente el 2 % p/p de B27. Y además, el medio puede comprender adicionalmente un antibiótico tal como gentamicina o un aminoácido tal como L-glutamina, de acuerdo con las necesidades. Por supuesto, el antibiótico y el aminoácido pueden sustituirse por otros materiales adecuados.

En el método de diferenciación de la presente invención, el cultivo puede realizarse en condiciones de cultivo usadas en los métodos de la técnica previa. Por ejemplo, el cultivo puede realizarse a 37 °C durante 7 a 14 días, preferiblemente durante aproximadamente 7 días. Se descubre en la presente invención que puede conseguirse un potencial de diferencial significativamente mayor cultivando en condiciones de baja presión parcial de oxígeno (es decir, condiciones de hipoxia). Por lo tanto, en el método de diferenciación de la presente invención, el cultivo puede realizarse preferiblemente en condiciones de hipoxia que tienen del 2 % al 10 % de presión parcial de oxígeno.

Las neuronas dopaminérgicas obtenidas por el método de diferenciación de la presente invención pueden recogerse de acuerdo con métodos convencionales. Por ejemplo, las células diferenciadas pueden recogerse separando las células con una enzima tal como Accutase (PAA), y después centrifugando las células obtenidas a 1000 rpm durante aproximadamente 5 minutos para retirar el sobrenadante.

La presente invención también proporciona un medio para diferenciar células progenitoras neurales humanas en neuronas dopaminérgicas, cuyo medio es un medio NB que comprende ácido fusárico, db-AMPC, forskolina, y B27.

El medio de diferenciación puede prepararse añadiendo ácido fusárico a un medio de la técnica previa para diferenciación dopaminérgica, como se ha descrito anteriormente.

Como se ha descrito anteriormente, el medio de diferenciación puede ser preferiblemente un medio NB que comprende de 50 μ M a 4 mM de ácido fusárico, de 50 μ M a 4 mM de db-AMPC, de 5 μ M a 20 mM de forskolina, y del 0,5 % p/p al 5 % p/p de B27, más preferiblemente un medio NB que comprende de 50 μ M a 1 mM de ácido fusárico, de 50 μ M a 1 mM de db-AMPC, de 5 μ M to 15 μ M de forskolina, y del 0,5 % p/p al 3 % p/p de B27. Más preferiblemente, el medio puede ser un medio NB que comprende aproximadamente 100 μ M de ácido fusárico, aproximadamente 100 μ M de db-AMPC, aproximadamente 10 μ M de forskolina, y aproximadamente el 2 % p/p de B27. Además, el medio puede comprender adicionalmente un antibiótico tal como gentamicina o un aminoácido tal como L-glutamina, de acuerdo con las necesidades. Por supuesto, el antibiótico y el aminoácido pueden sustituirse por otros materiales adecuados.

La presente invención se describirá en detalle adicional con referencia a los siguientes ejemplos experimentales. Estos ejemplos experimentales son con fines ilustrativos solamente y no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplo

Materiales y métodos

(1) Aislamiento de células progenitoras neurales humanas (hNPC)

Se aislaron células progenitoras neurales humanas de los fetos humanos (de aproximadamente 14 semanas de edad) abortados espontáneamente por atonía uterina de las madres. Las muestras fetales se obtuvieron bajo el consentimiento informado previo de los progenitores. La recogida de muestra y su uso para investigación estaban aprobados por el comité ético del Hospital CHA.

Las células progenitoras neurales humanas se aislaron de acuerdo con el método descrito, por ejemplo, en Storch et al. 2001; y Milosevic et al. 2006, 2007. Se aisló tejido mesencefálico ventral del tejido cerebral de fetos de 14 semanas de edad; y después se disoció en una suspensión celular única por tratamiento en una solución que contenía 0,1 mg/ml de papaína y 100 μ g/ml DNasa a 37 °C durante aproximadamente 30 minutos. La suspensión se lavó con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y después se incubó en 50 μ g/ml de antipapaína a 37 °C durante aproximadamente 30 minutos. Las células progenitoras neurales humanas (hNPC) resultantes se sembraron, en una monocapa (a una densidad de 30.000 células/cm²), en una placa de cultivo pre-recubierta con 15 μ g/ml de poli-L-ornitina y 4 μ g/ml de fibronectina y después se cultivaron.

(2) Diferenciación y aislamiento

Para la diferenciación dopaminérgica, las hNPC se sembraron en una placa de cultivo pre-recubierta con 15 µg/ml de poli-L-ornitina y 4 µg/ml de fibronectina a una densidad de 30.000 células/cm²; y después de 2 ó 3 días las células se cultivaron en un medio NB que comprendía agentes inductores de diferenciación tales como 2 % de suplemento B27 sin AO (GIBCO), 10 µM de forskolina, 1 mM de db-AMPC y 1 mM de ácido fusárico, a 37 °C durante 7 días, salvo que se describa de otro modo.

Las células diferenciadas, es decir, neuronas dopaminérgicas, se recogieron de acuerdo con lo siguiente: El medio de cultivo se retiró de la placa de cultivo. Las células se lavaron con una solución de tampón y después se trataron con Accutase (PAA) durante 30 minutos para desprender las células. Las células se lavaron de nuevo con una solución de tampón y después se centrifugaron a 1000 rpm durante aproximadamente 5 minutos. El sobrenadante se retiró para recoger las neuronas dopaminérgicas diferenciadas.

(3) Extracción de ARN, transcripción inversa y PCR cuantitativa a tiempo real

Se extrajeron los ARN celulares totales de las hNPC, usando Trizol y cloroformo. Los ADNc se sintetizaron a partir de 500 ng de los ARN totales, usando RTasa de ARN Superscript II, cebadores Oligo-d(T), DTT y dNTP, de acuerdo con el protocolo del fabricante. La PCR se realizó en un volumen final de 20 µl que contiene 1 µl de ADNc y 1 µl de cebadores 10 pM, usando una mezcla SYBR-Green. Se analizaron las expresiones de TH, DAT, GFAP, Nurr1, Tuj1, y Lmx1a, usando RPL22 como control interno. La PCR cuantitativa a tiempo real se realizó usando el sistema LightCycler. La amplificación se controló y analizó a través de la medición de la unión del colorante fluorescente SYBR Green a ADN bicatenario. Los ADN diana se amplificaron realizando un total de 40 ciclos, en las condiciones de 95 °C durante 10 segundos, 60 °C durante 10 segundos, 72 °C durante 20 segundos. La extensión final se realizó a 72 °C durante 10 minutos. Los resultados se expresaron respecto al gen RPL-22 por el método comparativo de Ct. Los cebadores usados en la PCR se describen en la Tabla 1.

<Tabla 1 >

Gen	Cebador	Secuencia	SEC ID	tamaño de los productos
TH	Cebador con sentido	5'-agccctaccaagaccagacg-3'	1	132 pb
	Cebador antisentido	5'-gcgtgtacgggtcgaactt-3'	2	
Tuj1	Cebador con sentido	5'-gggccttggacatctcttc-3'	3	90 pb
	Cebador antisentido	5'-cctccgtgtagtacccttg-3'	4	
Nestina	Cebador con sentido	5'-cagctggcgacacccaagatg-3'	5	208 pb
	Cebador antisentido	5'-agggaggtgggctcaggactgg-3'	6	
Sox2	Cebador con sentido	5'-gccgagtggaaactttgtc-3'	7	264 pb
	Cebador antisentido	5'-gttcattgtgcgcgtaactgt-3'	8	
Musashi1	Cebador con sentido	5'-acagcccaagatggtagctc-3'	9	191 pb
	Cebador antisentido	5'-ccacgatgtcctcacttca-3'	10	
Lmx1a	Cebador con sentido	5'-tgcttagcccaggactttca-3'	11	136 pb
	Cebador antisentido	5'-tgaagatggaggagagctg-3'	12	
PAX6	Cebador con sentido	5'-ccaaagtgggtgacaagattgcc-3'	13	419 pb
	Cebador antisentido	5'-taactccgcccattcactgacg-3'	14	
VMAT2	Cebador con sentido	5'-atccagaccaccagaccagag-3'	15	616 pb
	Cebador antisentido	5'-ccccatccaagagcaccaagg-3'	16	
Pitx3	Cebador con sentido	5'-tgtcattctcagatgcaggcac-3'	17	400 pb
	Cebador antisentido	5'-tgaccgagtttaaggcggaac-3'	18	
DAT	Cebador con sentido	5'-tgcgtgccacatcaataaca-3'	19	170 pb
	Cebador antisentido	5'-aacatccttcactcagtattgctaa-3'	20	
Nurr1	Cebador con sentido	5'-cgaccaagacctgcttttg-3'	21	125 pb
	Cebador antisentido	5'-attgcaacctgtgcaagacc-3'	22	
GIRK2	Cebador con sentido	5'-gggcaaacccttctcttc-3'	23	212 pb
	Cebador antisentido	5'-ggcactttgcactttcatca-3'	24	
Lmx1a	Cebador con sentido	5'-tgcttagcccaggactttca-3'	25	136 pb
	Cebador antisentido	5'-tgaagatggaggagagctg-3'	26	
RPL22	Cebador con sentido	5'-cacgaaggaggatgactgg-3'	27	116 pb
	Cebador antisentido	5'-tgtggcacaccactgacatt-3'	28	

(4) Inmunocitoquímica

Las hNPC se lavaron con PBS tres veces y después se fijaron con paraformaldehído al 4 % en PBS durante 10 minutos. Las células se lavaron con PBS tres veces y después se bloquearon por reacción con suero de cabra normal al 3 %, Triton X-100 al 0,2 % y BSA al 1 % en PBS a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de

incubación con anticuerpos primarios, es decir, anticuerpo anti-TH (de conejo anti-TH, Pelfreez), anti-Tuj1 (de ratón anti-Tuj1, Millipore, CA. EEUU), anti-nestina (de conejo anti-nestina, COVANCE, CA, EEUU), anti-GFAP (de ratón anti-GFAP, Millipore, CA. EEUU), anti-Ki67 (de ratón anti-Ki67, Leica), anti-04 (de ratón anti-04, Millipore), anti-Sox2 (de conejo anti-Sox2, Abcam), anti-VMAT2 (de conejo anti-VMAT2, Abcam), anti-Pitx3 (de conejo anti-Pitx3, Millipore), anti-DAT (de conejo anti-DAT, Santa Cruz), anti-Nurr1 (de conejo anti-Nurr1, Santa Cruz), anti-NeuN (de ratón anti-NeuN, Millipore), anti-GIRK2 (de conejo anti-GIRK2, Alomone lab), anti-Cal28K (de ratón anti-Cal28K, Sigma), anti-glutamato (de conejo anti-glutamato, Sigma), anti-GABA (de conejo anti-GABA, Sigma), anti-ChAT (de ratón anti-ChAT, Millipore) y anti-5-HT (de conejo anti-5-HT, ImmunoStar) a 4 °C durante una noche, las células se lavaron con PBS tres veces y después se incubaron con anticuerpos secundarios, es decir, anticuerpo anti-ratón (Alexa Fluor™ 488), anti-ratón (Alexa Fluor™ 594), anti-conejo (Alexa Fluor™ 488), y anti-conejo (Alexa Fluor™ 594) a temperatura ambiente durante 60 horas, seguido de tinción con contraste con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol).

(5) Inmunotransferencia

Se extrajeron las proteínas con una solución de tampón RIPA [HEPES-KOH 10 mM (pH 7,9), KCl 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, NP-40 al 0,1 %] suplementado con inhibidores de proteasa (PI) (Roche Molecular Biochemicals). La concentración de proteínas se determinó usando un método BCA (Pierce). Las proteínas se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 10 %-SDS y después se transfirieron a una membrana de PVDF. Las membranas se bloquearon con leche desnatada al 5 % en una solución de tampón TBS-T a temperatura ambiente durante 2 horas, y después se incubaron con anticuerpos primarios, es decir, anticuerpo anti-TH (de conejo anti-TH, Pelfreez, 1:1000), anti-Tuj1 (de conejo anti-Tuj1, COVANCE, 1:5000), anti-nestina (de conejo anti-nestina, Abcam, 1:1000), anti-Sox2 (de conejo anti-Sox2, Abcam, 1:1000), anti-Bcl2 (de ratón anti-Bcl2, Santa Cruz, 1:200), anti-PCNA (de ratón anti-PCNA, Santa Cruz, 1:1000), anti-VMAT2 (de conejo anti-VMAT2, Abcam, 1:1000), anti-Pitx3 (de conejo anti-Pitx3, Millipore, 1:2000), anti-DAT (de conejo anti-DAT, Santa Cruz, 1:200), anti-Nurr1 (de conejo anti-Nurr1, Santa Cruz, 1:250), anti-actina (de conejo anti-actina, Santa Cruz, 1:5000) a 4 °C durante una noche. La membrana se incubó con anticuerpos secundarios anti-ratón y anti-conejo conjugados con HRP (peroxidasa de rábano rusticano) a temperatura ambiente durante 1 hora, y después se expuso con reactivos de detección de transferencia de western por quimioluminiscencia.

2. Resultados y análisis

(1) Evaluación de condiciones de diferenciación (condiciones del medio)

Las hNPC se diferenciaron en neuronas dopaminérgicas en medios obtenidos añadiendo interleuquina 1 beta, db-AMPC, y ácido fusárico (Fus), en diversas concentraciones y combinaciones, a un medio Neurobasal [control de medio de diferenciación (DM)]. Se midió TH (un marcador de neuronas dopaminérgicas) y Tuj1 (un marcador neural) a través de tinción DAPI (FIG. 1). A partir de los resultados de la FIG. 1, puede observarse que el uso del medio de cultivo que contiene db-AMPC y ácido fusárico mostró los mayores niveles de expresión de TH y Tuj1, es decir, el mayor potencial de diferenciación. Y también, puede observarse que, cuando se usaban db-AMPC y ácido fusárico en una concentración de 100 µM respectivamente, se obtenía el mayor potencial de diferenciación.

Las hNPC se hicieron proliferar en un medio DMEM/F12 (1:1) Glutamax, y después se hicieron diferenciar en neuronas en un medio Neurobasal (NB) que contenía 2 % de suplemento B-27 sin AO (GIBCO), 10 µM de forskolina, y 1 mM de db-AMPC, junto con o sin 100 µM de ácido fusárico. Después de inducción de la diferenciación, se midieron los niveles de expresión de TH y Tuj1 (FIG. 2). Los resultados de los análisis de inmunocitoquímica y RT-PCR se muestran en la en FIG. 3. A partir de los resultados de las FIG. 2 y 3, puede observarse que, cuando se añadía ácido fusárico, se expresaba de forma remarcadamente elevada TH (un marcador de neuronas dopaminérgicas). Y también, cuando se añadía ácido fusárico, también se aumentaba la expresión de Tuj1 (un marcador neuronal).

Para evaluar el potencial de sustitución de SHH y FGF8 caros que son de uso limitado como agente inductor de la diferenciación, las hNPC se hicieron proliferar en un medio DMEM/F12 (1:1) Glutamax. Después de inducción de la diferenciación en un medio Neurobasal (NB) (Invitrogen) usando un 2 % de B-27, 200 ng/ml de SHH, 25 ng/ml de FGF8, 10 µM de forskolina, 100 µM de ácido fusárico, y 100 µM de db-AMPC, se midieron los niveles de expresión de TH (FIG. 4). A partir de los resultados de la FIG. 4, puede observarse que, cuando se trataban con ácido fusárico en lugar de SHH y FGF8, las células se diferenciaban de forma más eficaz en neuronas dopaminérgicas. Y también, la diferenciación en neuronas dopaminérgicas estaba más aumentada, incluso cuando se añadía ácido fusárico además de SHH y FGF8.

Por lo tanto, a partir de los resultados de las FIG. 1 a 4, puede observarse que la inducción de la diferenciación de hNPC en un medio que contiene ácido fusárico puede conseguir potencial de diferenciación significativamente elevado en neuronas dopaminérgicas.

5 (2) Evaluación de condiciones de diferenciación (condiciones de cultivo)

Las hNPC se hicieron proliferar en un medio DMEM/F12 (1:1) Glutamax, y después se hicieron diferenciar en un medio Neurobasal (NB) (Invitrogen) que contenía 2 % de B-27, 10 μ M de forskolina, 100 μ M de ácido fusárico, y 100 μ M de db-AMPC, en condiciones de hipoxia (3 % de presión parcial de oxígeno) o condiciones de normoxia (21 % de presión parcial de oxígeno). Después de inducción de la diferenciación, se midieron los niveles de expresión de TH (FIG. 5). A partir de los resultados de la FIG. 5, puede observarse que las células se diferenciaban de forma más eficaz en neuronas dopaminérgicas en hipoxia que en normoxia.

15 (3) Análisis de los efectos neuroprotectores del ácido fusárico

Se sabe que el 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP) induce citotoxicidad en neuronas dopaminérgicas. Por lo tanto, se evaluaron las funciones del ácido fusárico durante la diferenciación, a través de la inducción de diferenciación en presencia de MPP (FIG. 6).

A partir de los resultados de la FIG. 6, puede observarse que sobrevivían más células que expresan TH cuando se inducía la diferenciación en el medio que contenía ácido fusárico, incluso en el tratamiento con MPP. Además, el marcador neuronal, es decir, Tuj1, también se expresaba relativamente más. Estos resultados sugieren que el ácido fusárico tiene actividad neuroprotectora, afectando de este modo a la viabilidad de las células que expresan TH, que hace que sobrevivan relativamente más neuronas dopaminérgicas.

25 (4) Evaluación de la diferenciación/proliferación

Las hNPC se hicieron proliferar en un medio DMEM/F12 (1:1) Glutamax, y después se cultivaron de forma continua en condiciones del 3 % de presión parcial de oxígeno, cambiando al mismo tiempo el medio en días alternos. Las hNPC obtenidas en pase prematuro (pase 7), pase intermedio (pase 11), y pase tardío (pase 17) se diferenciaron en medio NB (Invitrogen) que contenía un 2 % de B-27, 10 μ M de forskolina, 100 μ M de ácido fusárico, y 100 μ M de db-AMPC, en condiciones del 3 % de presión parcial de oxígeno, durante 7 días.

Se midieron los niveles de expresión de TH y Tuj1 a partir de las células respectivas (es decir, las células proliferadas y las células diferenciadas) obtenidas en el pase prematuro (pase 7), pase intermedio (pase 11), y pase tardío (pase 17) (FIG. 7). Los niveles de expresión de TH en las células se midieron mediante inmunocitoquímica (FIG. 8). Además, se midieron los niveles de expresión de nestina (un marcador de células madre neurales), Ki67 (un marcador de células proliferativas), Tuj1 (un marcador neuronal) usando inmunocitoquímica (FIG. 9). Las células TH-positivas en las células diferenciadas de acuerdo con la presente invención estaban aumentadas más del 20 %, en comparación con las células no diferenciadas (es decir, las células proliferadas). El potencial de diferenciación estaba aumentada hasta aproximadamente el 30 %, con el aumento del pase (véase la FIG. 7 A). Las células Tuj1-positivas después de la diferenciación también estaban aumentadas hasta el 40~45 % desde aproximadamente el 10 % (antes de la diferenciación), que no cambió en los pases tardíos (véase la FIG. 7 B). Los resultados fueron los mismos que en la inmunocitoquímica de las células TH-positivas; y el potencial de diferenciación estaba aumentado, con el aumento del pase (véase la FIG. 8). Después de la diferenciación, se redujeron las expresiones de nestina y ki67, mientras que se aumentó la expresión de Tuj1 (véase la FIG. 9). Estos resultados sugieren que, según procede la diferenciación, las células en proliferación no solamente pierden gradualmente su pluripotencia sino que también se diferencian en neuronas maduras.

Y también, como resultado del análisis FACS realizado sobre las hNPC en pase prematuro (pase 7), los marcadores superficiales de células madre neurales (es decir, CD15, 184, y 133) se redujeron significativamente después de la diferenciación, en comparación con antes de la diferenciación (véase la FIG. 10). Estos resultados muestran que las células están perdiendo su pluripotencia y están cambiando a células diferenciadas. Y también, como los resultados de los análisis de RT-PCR, cuando se aumenta el pase, la expresión de TH (un marcador de neuronas dopaminérgicas) se mantenía normalmente; la expresión de Tuj1 (un marcador de células neurales) se aumentaba; y las expresiones de nestina, sox2, y musashi1 (marcadores de células madre neurales) se disminuían (véase la FIG. 11 A). En los análisis de transferencia de Western, cuando se aumenta el pase, la expresión de TH se mantenía normalmente; la expresión de Tuj1 se aumentaba; y las expresiones de nestina y sox2 se disminuían (véase la FIG. 11 B), cuyos resultados son iguales que en los análisis de RT-PCR. Y también, Bcl2 (un marcador anti apoptótico) y PCNA (un marcador de proliferación) también estaban reducidos (véase la FIG. 11 B).

Por lo tanto, a partir de los resultados de las FIG. 7 a 11, puede observarse que, cuando las células se cultivaban hasta el pase tardío y después se diferenciaban en el medio de diferenciación mencionado, la diferenciación de las mismas se inducía en el mismo potencial de diferenciación que en las células en el pase prematuro.

(5) Caracterización de neuronas dopaminérgicas diferenciadas

Las hNPC se diferenciaron en un medio NB (Invitrogen) que contenía 2 % de B-27, 10 μ M de forskolina, 100 μ M de ácido fusárico, y 100 μ M de db-AMPC en condiciones del 3 % de presión parcial de oxígeno durante 14 días.

A partir de las células resultantes, se midieron las expresiones de TH y los marcadores de neuronas dopaminérgicas maduras (NeuN, VMAT2, Nurr1, y Pitx3) a través de inmunocitoquímica (FIG. 12A). Para identificar el tipo de las células que expresan TH (es decir, tipo A9 o tipo A10), se midieron las expresiones de Girk2 y cal28K a través de inmunocitoquímica (FIG. 12B). Si se co-expresan tanto Girk2 como TH, las células se consideran como tipo A9. Si se co-expresan tanto cal28K como TH, las células se consideran como tipo A10. A partir de los resultados de la FIG. 12, puede observarse que las neuronas dopaminérgicas obtenidas de acuerdo con el método de diferenciación de la presente invención son neuronas dopaminérgicas maduras de tipo A9.

Y también, como los resultados de los análisis de RT-PCR, los marcadores de neuronas dopaminérgicas maduras tales como VMAT2, Pitx3, DAT, Nurr1, así como TH, estaban remarcadamente aumentados después de la diferenciación (+), en comparación con antes de la diferenciación (-) (véase la FIG. 13 A). En los análisis de transferencia de Western, los marcadores de neuronas dopaminérgicas maduras tales como VMAT2, Pitx3, DAT, Nurr1, así como TH, estaban remarcadamente aumentados después de la diferenciación (+), en comparación con antes de la diferenciación (-) (véase la FIG. 13B). Estos resultados son iguales que los resultados de inmunocitoquímica (véase la FIG. 13 C). A través de inmunocitoquímica, se confirmó que los marcadores de neuronas dopaminérgicas maduras estaban remarcadamente aumentados desde el séptimo día hasta el decimocuarto día después de la inducción de la diferenciación.

Y también, para identificar la diferenciación en otros subtipos de neuronas, se midieron las expresiones de glutamato, GABA, ChAT y serotonina a través de inmunocitoquímica (FIG. 14). A partir de los resultados de la FIG. 14, puede observarse que se expresaban otros subtipos de neuronas en cantidades significativamente inferiores que las neuronas dopaminérgicas.

<Referencia>

- 1: Bjorklund, A. et al. Reconstruction of the nigro-striatal dopamine pathway by intra-cerebral nigral transplants, Brain Res. 1979;177:555-560
- 2: Perlow, M., et al. Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system. Science 1979;204:643-647
- 3: Brain J. Snyder. et al. Stem cell treatment for parkinson's disease: an update for 2005, Current Opinion in Neurology. 2005;18:376-385
- 4: Storch A. et al Midbrain-derives neural stem cells: from basic science to therapeutic approaches. Cell tissue Res. 2004;318:15-22
- 5: Yang M. et al. Neural stem cells spontaneously express dopaminergic traits after transplantation into the intact or 6-hydrodopamine lesioned rat. Exp Neural, 2002;177:50-60
- 6: Sanchez-Pernaute, R. et al. In vitro generation and transplantation of precursor-derived human dopamine neurons. J. Neurosci. Res. 2001;65(4). 284-288
- 7: Riaz, S.S. et al. The differentiation potential of human foetal neuronal progenitor cells in vitro. Brain Res. Dev. Brain Res. 2004;153(1), 39-51
- 8: Jaroslaw Maciaczyk et al. Combined use of BDNF, ascorbic acid, low oxygen, and prolonged differentiation time generates tyrosine hydroxylase-expressing neurons after long-term in vitro expansion of human fetal midbrain precursor cells. Experimental Neurology. 2008;213:354-362

<110> College of Medicine Pochon CHA University Industry-Academic Cooperation Foundation

<120> Método para diferenciar células progenitoras neurales humanas en neuronas dopaminérgicas, y medio para la diferenciación de las mismas

<130> PX0081PCT

<150> KR10-2010-0055832

<151> 14-06-2010

<160> 28

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador con sentido

 5 <400> 1
 agccctacca agaccagacg 20

 <210> 2
 <211> 19
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador antisentido

 15 <400> 2
 gcgtgtacgg gtcgaactt 19

 <210> 3
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador con sentido
 25
 <400> 3
 gggcctttgg acatctcttc 20

 <210> 4
 30 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 35 <223> Cebador antisentido

 <400> 4
 cctccgtgta gtagcccttg 20
 40
 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> Cebador con sentido

 <400> 5
 50 cagctggcgc acctcaagat g21

 <210> 6
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Cebador antisentido

 <400> 6
 60 aggggaagttg ggctcaggac tgg 23

 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador con sentido

 5 <400> 7
 gccgagtggg aactttgtc 20

 10 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Cebador antisentido

 <400> 8
 gttcatgtgc gcgtaactgt 20

 20 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Cebador con sentido

 <400> 9
 acagcccaag atggtgactc 20

 30 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 35 <220>
 <223> Cebador antisentido

 <400> 10
 ccacgatgtc ctcactctca 20

 40 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> Cebador con sentido

 <400> 11
 tgcttagccc aggactttca20
 50

 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55

 <220>
 <223> Cebador antisentido

 <400> 12
 60 tgaagatgga gggagagctg 20

 <210> 13
 <211> 23
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador con sentido

 <400> 13
 5 ccaaagtggt ggacaagatt gcc 23

 <210> 14
 <211> 22
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador antisentido

 <400> 14
 15 taactccgcc cattcactga cg 22

 <210> 15
 <211> 21
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador con sentido
 25
 <400> 15
 atccagacca ccagaccaga g 21

 <210> 16
 30 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 35 <223> Cebador antisentido

 <400> 16
 ccccatccaa gagcaccaag g 21

 <210> 17
 40 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 45 <223> Cebador con sentido

 <400> 17
 50 tgtcattctc agatgcaggc ac 22

 <210> 18
 <211> 19
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador antisentido

 <400> 18
 60 tgaccgagtt aaggcgaac 19

 <210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador con sentido

 <400> 19
 5 tgcgtgccac atcaataaca 20

 <210> 20
 <211> 25
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador antisentido

 <400> 20
 15 aacatccttc actcagtatt gctaa 25

 <210> 21
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador con sentido
 25
 <400> 21
 cgaccaagac ctgcttttg20

 <210> 22
 30 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 35 <223> Cebador antisentido

 <400> 22
 attgcaacct gtgcaagacc 20
 40
 <210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> Cebador con sentido

 <400> 23
 50 gggcaaacc ttctctctc 20

 <210> 24
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Antisene primer

 <400> 24
 60 ggcactttgc acttcatca 20

 <210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador con sentido

 5 <400> 25
 tgcttagccc aggacttca20

 <210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador antisentido

 15 <400> 26
 tgaagatgga gggagagctg 20

 <210> 27
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador con sentido
 25
 <400> 27
 cacgaaggag gagtgactgg 20

 <210> 28
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador antisentido
 35
 <400> 28
 tgtggcacac cactgacatt 20

REIVINDICACIONES

1. Un método para diferenciar células progenitoras neurales humanas en neuronas dopaminérgicas, que comprende cultivar células progenitoras neurales humanas en un medio que comprende ácido fusárico.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medio se prepara añadiendo ácido fusárico a un medio para la diferenciación dopaminérgica que comprende dibutilil cíclico adenosina monofosfato (db-AMPC), forskolina, B27, sonic hedgehog (SHH) y factor de crecimiento de fibroblastos 8 (FGF8).
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el medio es un medio NB que comprende ácido fusárico, db-AMPC, forskolina y B27.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el medio es un medio NB que comprende de 50 μ M a 4 mM de ácido fusárico, de 50 μ M a 4 mM de db-AMPC, de 5 μ M a 20 μ M de forskolina y del 0,5 % p/p al 5 % p/p de B27.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el medio es un medio NB que comprende 100 μ M de ácido fusárico, 100 μ M de db-AMPC, 10 μ M de forskolina y 2 % p/p de B27.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el cultivo se realiza en condiciones de hipoxia que tienen del 2 % al 10 % de presión parcial de oxígeno.
7. Un medio para diferenciar células progenitoras neurales humanas en neuronas dopaminérgicas, cuyo medio es un medio NB que comprende ácido fusárico, db-AMPC, forskolina y B27.
8. El medio de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el medio es un medio NB que comprende de 50 μ M a 4 mM de ácido fusárico, de 50 μ M a 4 mM de db-AMPC, de 5 μ M a 20 μ M de forskolina y del 0,5 % p/p al 5 % p/p de B27.
9. El medio de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el medio es un medio NB que comprende 100 μ M de ácido fusárico, 100 μ M de db-AMPC, 10 μ M de forskolina y 2 % p/p de B27.

FIG. 1

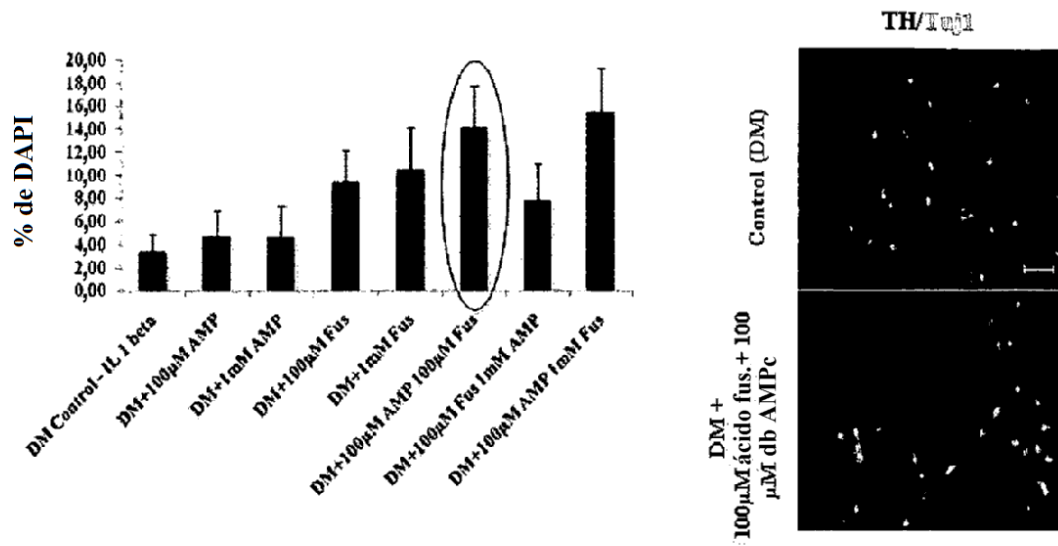


FIG. 2

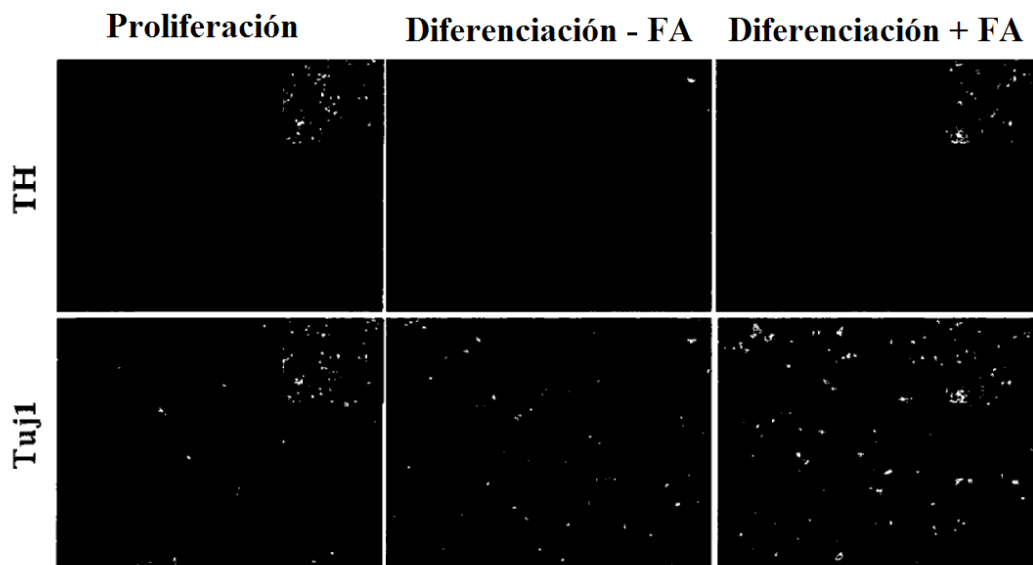


FIG. 3

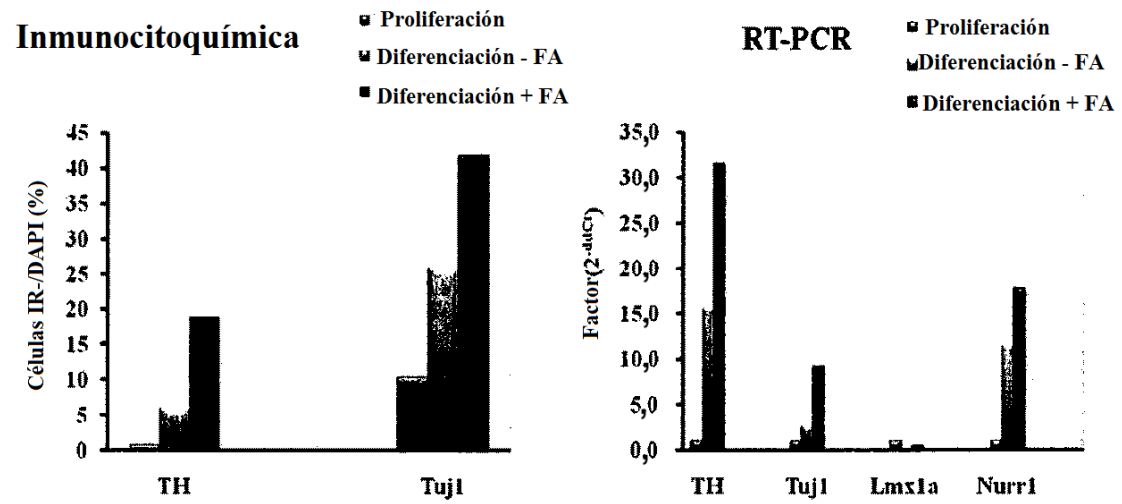


FIG. 4

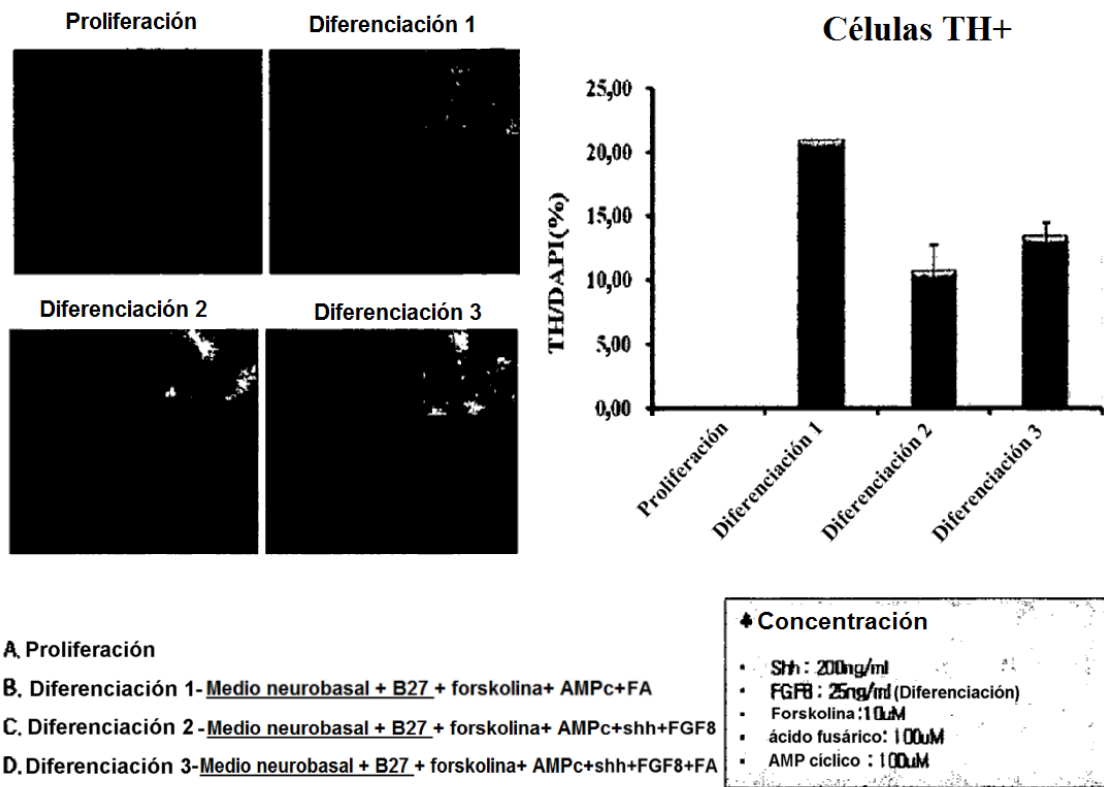


FIG. 5

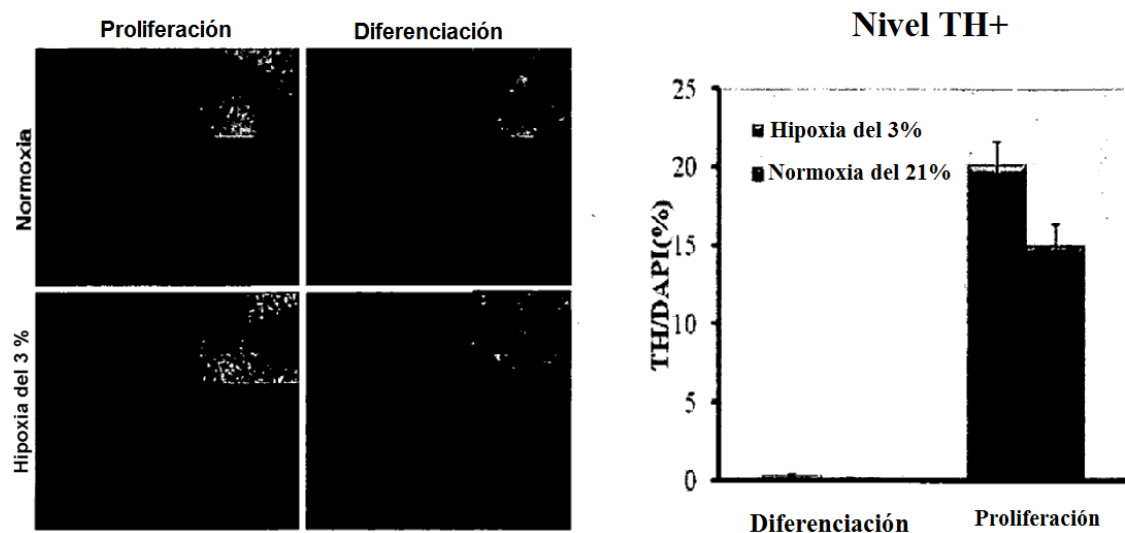


FIG. 6

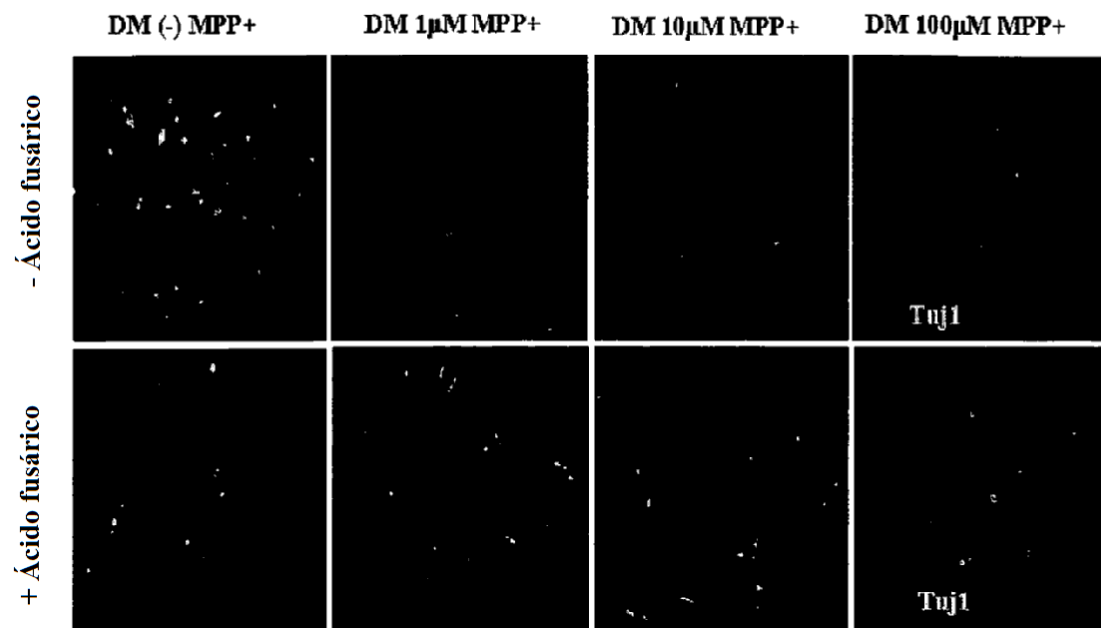


FIG. 7

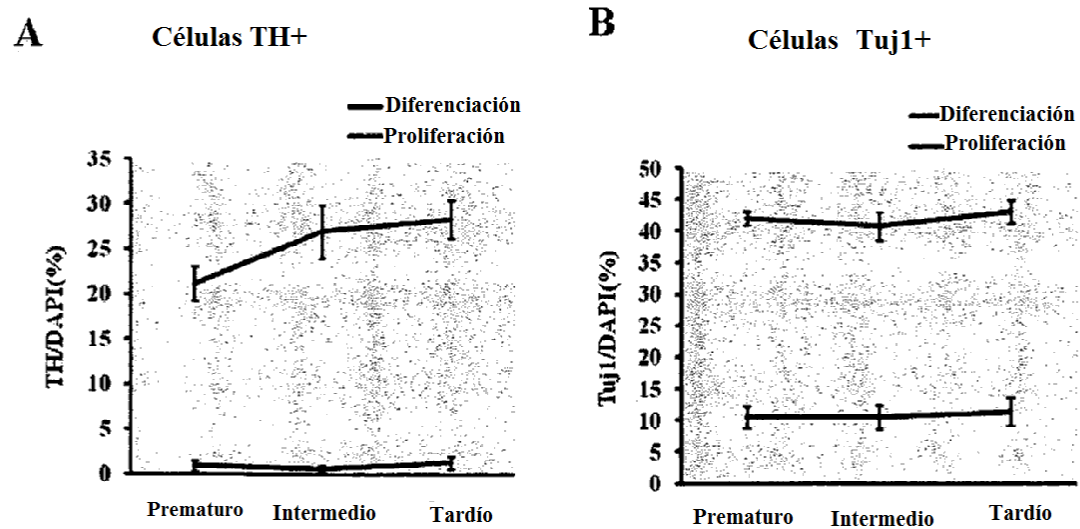


FIG. 8

Células TH+

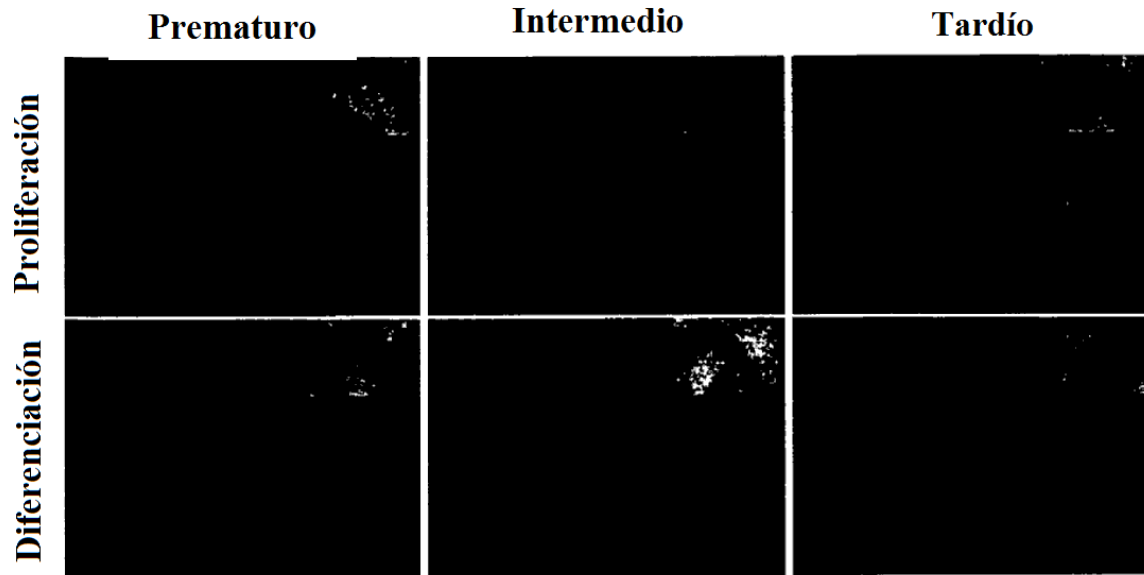


FIG. 9

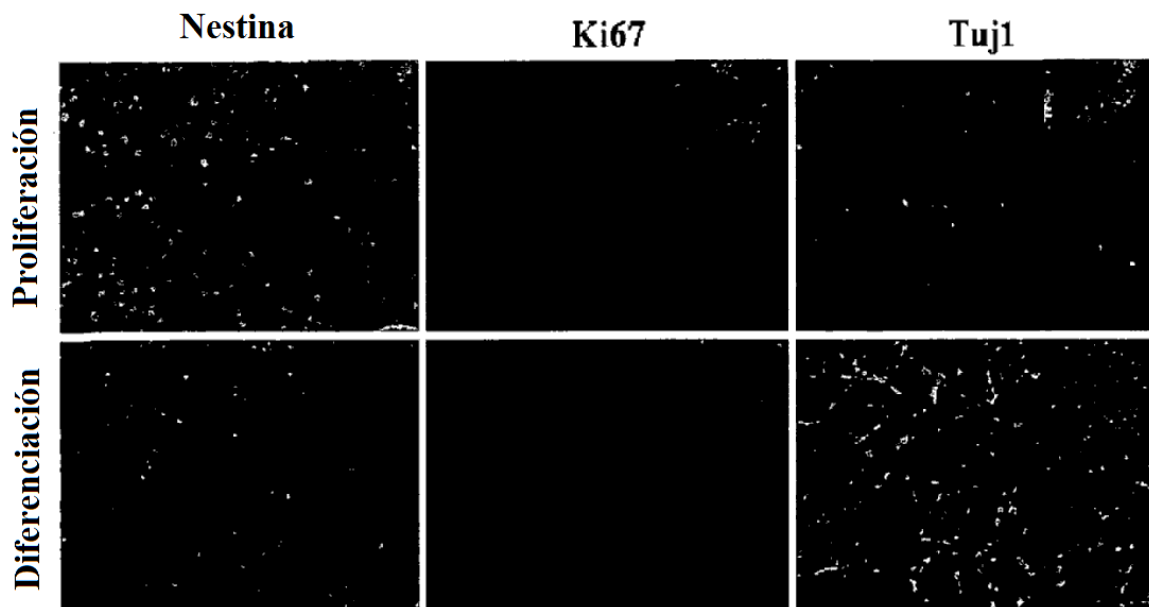


FIG. 10

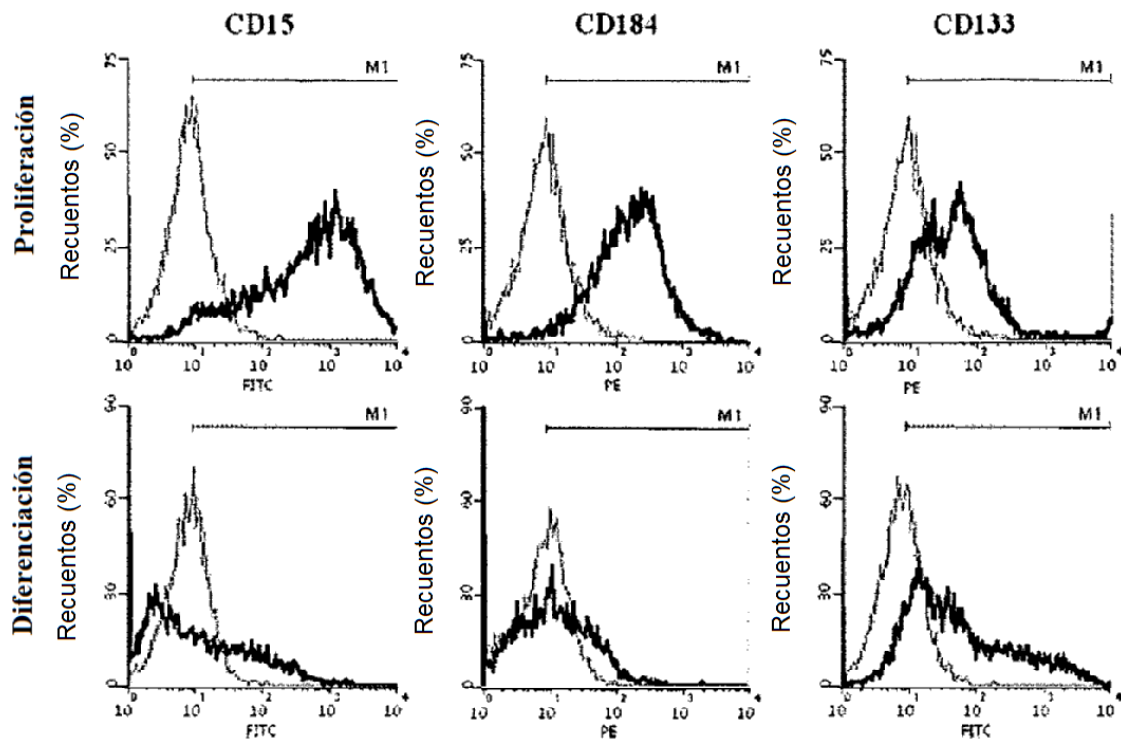


FIG. 11

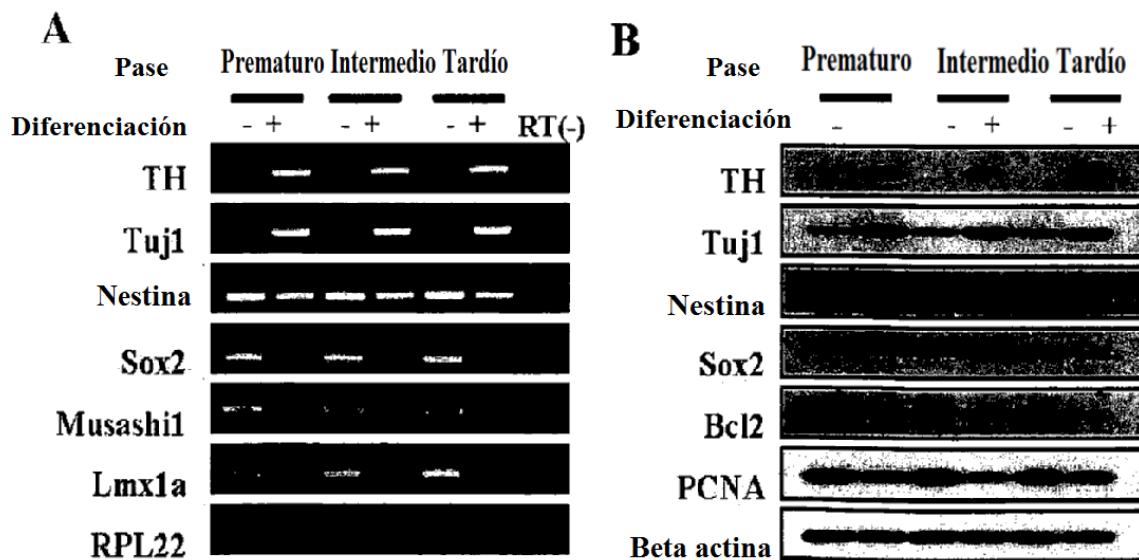


FIG. 12

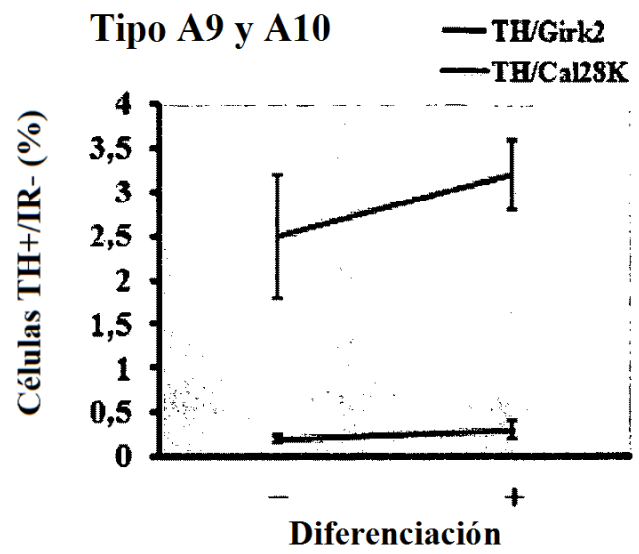
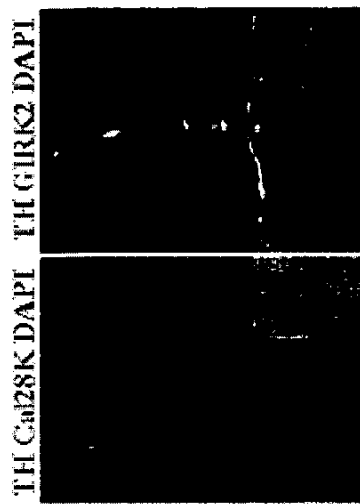


FIG. 13

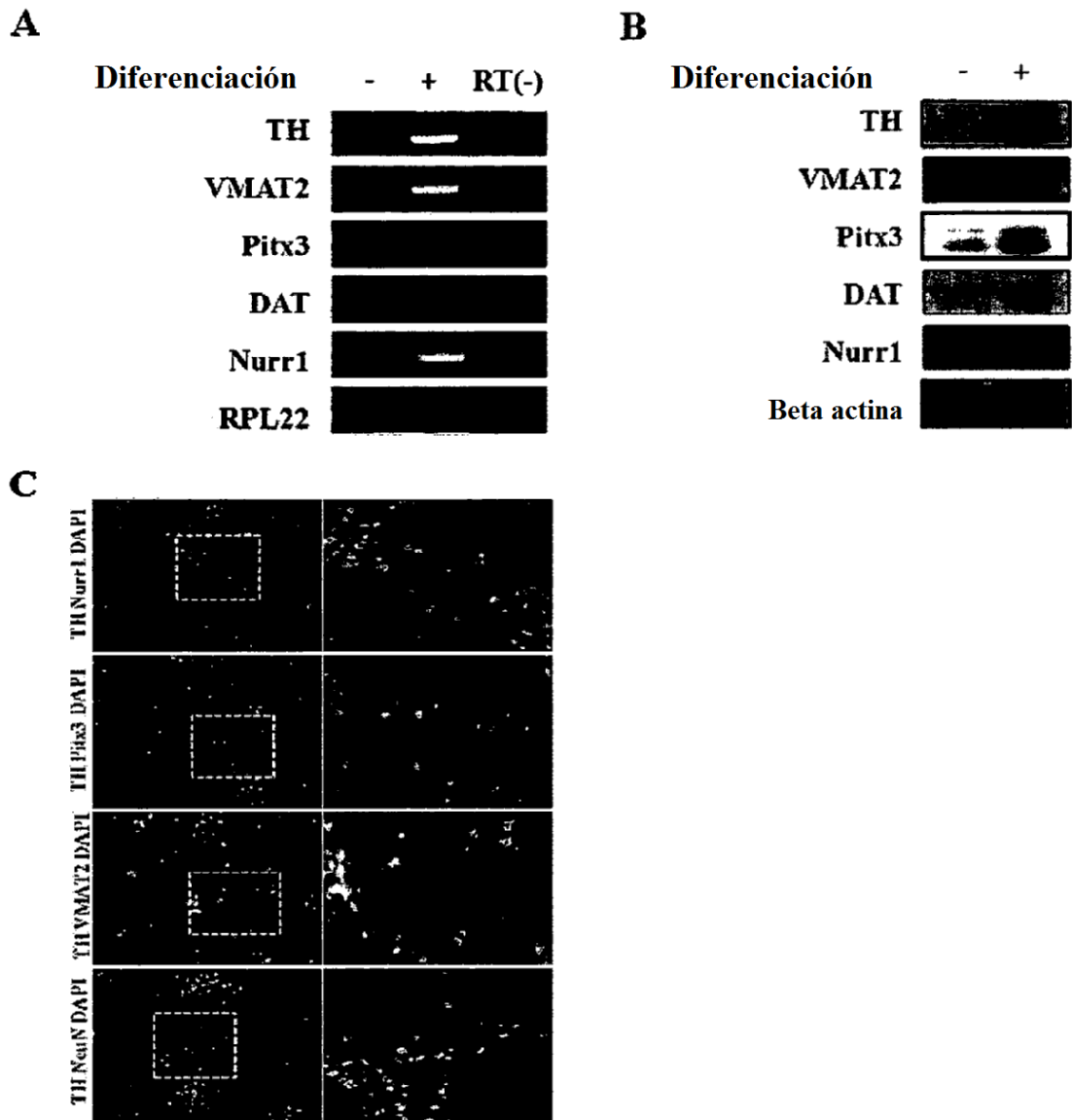


FIG. 14

