

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 044**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 5/073 (2010.01)

C12N 5/074 (2010.01)

A61K 35/12 (2006.01)

A61K 35/51 (2015.01)

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2004 E 04756395 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 1641913**

54 Título: **Células posparto derivadas de tejido del cordón umbilical y métodos de preparación y uso de las mismas**

30 Prioridad:

27.06.2003 US 483264 P

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

17.03.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MISTRY, SANJAY;
KIHM, ANTHONY J.;
HARRIS, IAN ROSS;
HARMON, ALEXANDER M.;
MESSINA, DARIN J.;
SEYDA, AGNIESZKA;
YI, CHIN-FENG y
GOSIEWSKA, ANNA**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 564 044 T3

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

Células posparto derivadas de tejido del cordón umbilical y métodos de preparación y uso de las mismas**DESCRIPCIÓN****5 CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a terapia de células de mamífero, preferentemente humanas, y más particularmente a células aisladas derivadas del cordón umbilical posparto, métodos de derivación de tales células y métodos de su uso.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

A medida que ha avanzado el moderno entendimiento de la enfermedad, la posible utilidad de la terapia de células para mejorar el pronóstico de aquellos afectados ha producido un elevado interés en nuevas fuentes de células humanas útiles para fines terapéuticos. Una fuente tal de células humanas es tejidos posparto y, en particular, el cordón umbilical.

15

Recientemente, la atención se ha centrado en guardar en un banco de sangre del cordón umbilical (o simplemente "sangre del cordón") como una posible fuente de, por ejemplo, células hematopoyéticas para su uso por un individuo para el que la sangre del cordón se ha almacenado en el banco al nacer. Tales células serían útiles para aquellos individuos, por ejemplo, que requieren radiación terapéutica que puede eliminar porciones funcionales de su sistema inmunitario. En vez de requerir un donante de médula ósea cuidadosamente compatible para evitar el rechazo, la sangre del cordón guardada en el banco del propio individuo podría usarse para reconstituir las células inmunitarias perdidas, y restaurar la función inmunitaria.

20

25

Todavía más recientemente, ha habido interés en obtener citoblastos de sangre del cordón, debido a las posibles aplicaciones terapéuticas más amplias de tales células. Los citoblastos son entendidos en términos generales como células que 1) tienen la capacidad de auto-renovarse durante largos periodos mediante la división celular de una única célula; y 2) tienen la capacidad de diferenciarse en tipos específicos de células dadas las condiciones apropiadas. Por consiguiente, los citoblastos son posiblemente útiles en el tratamiento de una población de individuos, y no simplemente la persona de cuya sangre del cordón se obtuvieron inicialmente las células.

30

En particular, la sangre del cordón se ha considerado una fuente de citoblastos progenitores hematopoyéticos. Se ha considerado útil la sangre del cordón guardada en banco (o criopreservada), o citoblastos aislados de la misma, para la reconstitución hematopoyética, por ejemplo, en trasplantes de médula ósea y relacionados (Boyse et al., patentes de EE.UU. N° 5.004.681 y 5.192.553).

35

Además de sangre del cordón, se han explorado otras fuentes de células terapéuticas del cordón umbilical humano, que incluyen células aisladas de la gelatina de Wharton, tejido de la vena o arteria umbilical, y la propia matriz umbilical. Tales células han estado en su mayoría sin caracterizar, o solo se han caracterizado mínimamente con respecto a sus propiedades fisiológicas, bioquímicas, inmunológicas y genéticas.

40

Por ejemplo, Purchio et al. (patente de EE.UU. N°: 5.919.702) han aislado células progenitoras condrogénicas (o precondrocitos) de la gelatina de Wharton. Informaron del aislamiento de células de gelatina de Wharton del cordón umbilical humano eliminando sangre y vasos sanguíneos e incubando el tejido en condiciones que pretendieran permitir que los precondrocitos proliferaran. Como tal, el método no distinguió las células deseadas de los diferentes tipos de células presentes en la gelatina de Wharton, sino que se basó en la migración del tejido o seleccionando condiciones de crecimiento que favorecieron los precondrocitos. Los precondrocitos se expandieron mitóticamente después de establecerse. Se informó que las células en los pases 2 a 4 eran útiles para producir cartilago, si se produjo mediante la adición de factores de crecimiento exógenos, tales como BMP-13 o TGF-beta. Se propusieron usos de las células para inyección o implantación directa, o uso con un hidrogel o matriz de tejido. Sin embargo, se consideró importante que las células no superaran aproximadamente el 25 % de confluencia. Las células no se caracterizaron con respecto a sus propiedades bioquímicas o inmunológicas, o con respecto a su expresión génica.

45

50

Weiss et al. (publicación de solicitud de patente de EE.UU. US2003/0161818) propusieron procedimientos para aislar células pluripotentes o comprometidas al linaje de gelatina de Wharton de mamífero o fuentes de matriz del cordón umbilical no de sangre. Se informó que las células aisladas se diferenciaron en líneas hematopoyéticas, mesenquimatosas o neuroectodérmicas. Las líneas celulares no se caracterizaron con respecto a sus propiedades identificadoras. Se proporcionó caracterización limitada con respecto a células después de la diferenciación hacia líneas neurales. Se hizo referencia a células bovinas y porcinas derivadas de gelatina de Wharton que fueron CD34⁺, CD45⁻.

55

60

Weiss et al. también informaron de la investigación del trasplante de células de la matriz del cordón umbilical porcino en cerebro de rata (Exp. Neur. 182: 288-299, 2003). No se usó tratamiento enzimático en el procedimiento de aislamiento. Obtuvieron dos poblaciones distintas - células mesenquimatosas esféricas y planas. Las células se modificaron genéticamente para expresar GFP. No pareció que las células estimularan el rechazo inmunitario

65

cuando se implantaron en especies cruzadas.

Mitchell et al. (Stem Cells 21:50-60, 2003) informaron de la obtención de células de la matriz de gelatina de Wharton de cordones umbilicales porcinos. Se informó que las células sin diferenciar fueron positivas para telomerasa y también se informó una subpoblación positiva para la expresión de c-kit, es decir, telomerasa⁺, CD117⁺. También se informó que las células produjeron alfa-actina de músculo liso, indicativo de su naturaleza similar a miofibroblastos. Las células pudieron supuestamente diferenciarse a lo largo de líneas neurales en presencia de factores de crecimiento. Sin embargo, se encontró que tanto las células diferenciadas como sin diferenciar expresaban NSE, un marcador para citoblastos neurales. Se reconoció la necesidad de líneas clonales y la caracterización en términos de capacidad proliferativa, análisis del cariotipo y expresión de antígenos de HLA.

Romanov et al. (Stem Cells 21(1):105-110, 2003) informaron de un procedimiento para aislar células similares a citoblastos mesenquimatosos (MSC) de la vena del cordón umbilical humano. Su procedimiento implicó el tratamiento de tejido extirpado de la vena con colagenasa y se requirió que la digestión enzimática fuera corta (15 minutos) para obtener la población de células de interés (una capa subendotelial de la vena). En particular, el procedimiento evitó la inclusión de células de músculo liso (SMC) y fibroblastos dejando las capas más profundas del tejido intactas, eliminando supuestamente solo las capas externas. Se informó que la población de células "casi homogénea" contenía aproximadamente 0,5 -1 % de células endoteliales, que también se buscaba evitar. Se informó que las células eran predominantemente CD34⁻ y que producían alfa-actina de músculo liso.

El documento WO 2004/072273 describe células progenitoras humanas que se extraen de gelatina de Wharton.

Lodie et al. (2002) Tissue Engineering 8(5):739-751 describen el análisis de poblaciones supuestamente distintas de citoblastos multipotentes derivados de la médula ósea.

Tremain et al. (2001) Stem Cells 19:408-418 describen el análisis microSAGE de 2.353 genes expresados en una colonia derivada de células individuales de citoblastos mesenquimatosos humanos no diferenciados. Debido a la diversidad de las poblaciones de células que se encuentran en la matriz del cordón umbilical, hay una necesidad en la materia de métodos de aislamiento de células no sanguíneas definidas y poblaciones de las mismas derivadas de cordón umbilical de mamífero; además de una necesidad de líneas celulares derivadas de cordón umbilical de mamífero que se caracterizan con respecto a su bioquímica (por ejemplo, secreción de factores de crecimiento), inmunología (marcadores de la superficie celular y potencial para estimular respuestas inmunitarias) y expresión de diversos genes. Esta necesidad es particularmente convincente para células derivadas del cordón umbilical humano.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La invención proporciona una célula aislada obtenible de tejido del cordón umbilical humano, en la que dicho tejido del cordón umbilical humano está sustancialmente libre de sangre, dicha célula es capaz de auto-renovación y expansión en cultivo y tiene el potencial de diferenciarse en células de otros fenotipos, dicha célula es capaz de expandirse en presencia de oxígeno de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 20 %, dicha célula requiere L-valina para el crecimiento, y en la que dicha célula tiene las siguientes características:

- a. potencial de experimentar al menos 40 duplicaciones en cultivo;
- b. unión y expansión sobre un recipiente de cultivo de tejido recubierto o sin recubrir, en la que el recipiente de cultivo de tejido recubierto comprende un recubrimiento de gelatina, laminina, colágeno, poliornitina, vitronectina o fibronectina;
- c. producción de vimentina y alfa-actina de músculo liso;
- d. producción de los marcadores de la superficie celular CD10, CD13, CD44, CD73, HLA-A,B,C, CD90 y PDGFr-alfa, como se detecta por citometría de flujo;
- e. elevada expresión de genes endógenos que codifican interleucina 8, reticulón 1, ligando 1 de quimiocinas (motivo C-X-C) (actividad estimulante del crecimiento de melanoma, alfa); ligando 6 de quimiocinas (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica de granulocitos); ligando 3 de quimiocinas (motivo C-X-C); proteína 3 inducida por factor de necrosis tumoral alfa, con respecto a la expresión endógena de interleucina 8, reticulón 1, ligando 1 de quimiocinas (motivo C-X-C) (actividad estimulante del crecimiento de melanoma, alfa); ligando 6 de quimiocinas (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica de granulocitos); ligando 3 de quimiocinas (motivo C-X-C); proteína 3 inducida por factor de necrosis tumoral alfa en una célula humana que es un fibroblasto, un citoblasto mesenquimatoso, o una célula de la médula ósea de las crestas ilíacas, como se caracteriza por matriz de oligonucleótidos;
- f. ausencia de producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ, como se detecta por citometría de flujo;
- g. secreción de MCP-1, IL-6, GCP-2, IL-8, TIMP1, TPO, KGF, HGF, FGF, HBEGF, BDNF e IL-8, como se detecta por ELISA;
- h. ausencia de secreción de SDF-1alfa, VEGF, TGF-beta2, ANG2 y PDGFbb, como se detecta por ELISA;
- i. ausencia de expresión de CD80, CD86, B7-H2, HLA-G y CD178, como se detecta por citometría de flujo;
- j. expresión de PD-L2, como se detecta por citometría de flujo; y
- k. una disminución en la expresión de los siguientes genes con respecto a una célula humana que es un

5 fibroblasto, un citoblasto mesenquimatoso, o una cresta íliaca, como se caracteriza por matriz de oligonucleótidos: homeocaja 2 de baja estatura; proteína 2 de 27 kDa de choque térmico; ligando 12 de quimiocinas (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células del estroma); elastina; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); homeocaja 2 del mesénquima; homólogo 1 de la homeocaja del seno ocular; cristalina, alfa B; activador asociado a dishevelled de la morfogénesis 2; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralina 1; tetranectina; dominio de homología tres con src (SH3) y rico en cisteína; gen 1 de translocalización de linfocitos B, antiproliferativo; 25-hidroxilasa del colesterol; factor de transcripción 3 relacionado con runt; proteína hipotética FLJ23191; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de la procolágeno C-endopeptidasa; homólogo 7 de frizzled; gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C; proteína 5 de la homeocaja de iroquois; hefaestina; integrina, beta 8; glicoproteína 2 de las vesículas sinápticas; ADNc FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor 1 de tipo receptor de citocinas; canal de potasio activado por calcio de conductancia intermedia/pequeña, subfamilia N, miembro 4; integrina, alfa 7; proteína DKFZP586L151; co-activador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ); homólogo 2 de la homeocaja del seno ocular; proteína KIAA1034; respuesta 3 de crecimiento temprano; homeocaja 5 distal-less; proteína hipotética FLJ20373; familia 1 de la aldo-ceto reductasa, miembro C3 (3-alfa hidroxiesteroide deshidrogenasa, tipo II); biglicano; fibronectina 1; proencefalina; integrina, 1 similar a beta (con dominios de repetición similares a EGF); clon de ADNc EUROIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor C del péptido natriurético/guanilato ciclasa C (receptor C del péptido atrionatriurético); proteína hipotética FLJ14054; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222); proteína 5 de la membrana asociada a vesícula; proteína de la matriz extracelular 1 similar a fibulina que contiene EGF; tipo 3 de proteína de 19 kDa de interacción BCL2/adenovirus E1B; proteína 1 de unión de AE; polipéptido 1 de la subunidad VIIa de la citocromo c oxidasa (músculo); neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; y factor de crecimiento similar a la proteína de unión a la insulina 2, 36 kDa.

25 La invención también proporciona un cultivo celular terapéutico que comprende la célula de la invención.

La invención también proporciona un método de derivación, a partir de tejido del cordón umbilical humano, de una célula aislada de la invención, comprendiendo el método las etapas de:

- 30 (a) obtener tejido del cordón umbilical humano;
- (b) eliminar sustancialmente toda la sangre para dar un tejido de umbilical sustancialmente libre de sangre;
- (c) disociar el tejido por tratamiento enzimático con colagenasa, dispasa e hialuronidasa;
- (d) resuspender el tejido en un medio de cultivo; y
- (e) proporcionar condiciones de crecimiento que permiten el crecimiento de la célula de la invención.

35 La invención también proporciona una matriz tridimensional que comprende una célula de la invención, y una matriz que comprende un polímero biocompatible o bioabsorbible.

La invención también proporciona un dispositivo implantable que comprende un cultivo celular de la invención.

40 La invención también proporciona una matriz de tejido humano implantable que comprende una célula de la invención.

45 En un primer aspecto, la invención proporciona células derivadas de tejido del cordón umbilical (UDC) aisladas que se derivan de tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre. Las células son capaces de auto-renovación y expansión en cultivo. Las células derivadas de tejido del cordón umbilical tienen el potencial de proliferar en células de otros fenotipos. Las células se han caracterizado en cuanto a varias de sus propiedades celulares, genéticas, inmunológicas y bioquímicas. Por ejemplo, las células se han caracterizado por sus propiedades de crecimiento en cultivo, por sus marcadores de la superficie celular, por su expresión génica, por su capacidad para producir ciertos factores tróficos bioquímicos y por sus propiedades inmunológicas.

50 En ciertas realizaciones, la célula derivada del posparto es una célula derivada de tejido del cordón umbilical. En realizaciones específicas, la célula tiene todas las características identificadoras de cualquiera de los tipos de células UMB 022803 (P7) (acceso ATCC N°. PTA-6067); o UMB 022803 (P17) (acceso ATCC N°. PTA-6068).

55 En otro de sus varios aspectos se proporcionan cultivos celulares que comprenden las células derivadas de tejido del cordón umbilical aisladas de la invención. Los cultivos de células derivadas de tejido del cordón umbilical están libres de células maternas en ciertas realizaciones preferidas.

60 Se proporcionan métodos de cultivo y expansión de células derivadas de tejido del cordón umbilical y cultivos celulares y poblaciones que las comprenden.

65 En otro aspecto de la invención se proporcionan células derivadas de tejido del cordón umbilical aisladas que tienen perfiles de expresión de marcadores de la superficie celular específicos, en las que se producen proteínas de marcador de la superficie celular particulares. En una realización particular de la divulgación, las células producen uno o más de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, CD141, PDGFr-alfa o HLA-A,B,C. Además, las células no producen uno o más de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 o HLA-DR,DP,DQ, como se detecta por citometría de flujo.

Las células de la invención también se han caracterizado según su expresión de una amplia variedad de genes. Por consiguiente, otro aspecto de la divulgación proporciona células derivadas del cordón umbilical aisladas, que con respecto a una célula humana que es un fibroblasto, un citoblasto mesenquimatoso, o una célula de la médula ósea de las crestas ilíacas, tienen expresión reducida de genes para uno o más de: homeocaja 2 de baja estatura; proteína 2 de 27 kDa de choque térmico; ligando 12 de quimiocinas (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células del estroma); elastina (estenosis aórtica supraaórtica, síndrome de Williams-Beuren); ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); homeocaja 2 del mesénquima (homeocaja específica de la detención del crecimiento); homólogo 1 de la homeocaja del seno ocular (*Drosophila*); cristalina, alfa B; activador asociado a dishevelled de la morfogénesis 2; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralina 1; tetranectina (proteína de unión al plasminógeno); dominio de homología tres con *src* (SH3) y rico en cisteína; 25-hidroxilasa del colesterol; factor de transcripción 3 relacionado con runt; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de la procolágeno C-endopeptidasa; homólogo 7 de frizzled (*Drosophila*); gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C (hexabraquiona); proteína 5 de la homeocaja de iroquois; hefaestina; integrina, beta 8; glucoproteína 2 de las vesículas sinápticas; neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; factor de crecimiento similar a la proteína de unión a la insulina 2, 36 kDa; ADNc de *Homo sapiens* FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor 1 de tipo receptor de citocinas; canal de potasio activado por calcio de conductancia intermedia/pequeña, subfamilia N, miembro 4; integrina, beta 7; co-activador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ); homólogo 2 de la homeocaja del seno ocular (*Drosophila*); proteína KIAA1034; proteína 5 de la membrana asociada a vesículas (miobrevina); proteína de la matriz extracelular 1 similar a fibulina que contiene EGF; respuesta 3 de crecimiento precoz; homeocaja 5 de distal-less; proteína hipotética FLJ20373; familia 1 de la aldo-ceto reductasa, miembro C3 (3-alfa-hidroxiesteroide deshidrogenasa, tipo II); biglicano; co-activador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ); fibronectina 1; proencefalina; integrina, 1 similar a beta (con dominios de repetición similares a EGF); inserto de longitud completa de ARNm de *Homo sapiens*; clon de ADNc EUROIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor C del péptido natriurético/guanilato ciclasa C (receptor C del péptido atrionatriurético); proteína hipotética FLJ14054; ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222); tipo 3 de proteína de 19 kDa de interacción BCL2/adenovirus E1B; proteína 1 de unión a AE; y polipéptido 1 de la subunidad VIIa de la citocromo c oxidasa (músculo). Además, estas células derivadas del cordón umbilical humano aisladas expresan un gen para cada una de interleucina 8; reticulón 1; ligando 1 de quimiocinas (motivo C-X-C) (actividad estimulante del crecimiento de melanoma, alfa); ligando 6 de quimiocinas (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica de granulocitos); ligando 3 de quimiocinas (motivo C-X-C); y factor de necrosis tumoral, proteína 3 inducida por alfa, en las que la expresión es elevada con respecto a la de una célula humana que es un fibroblasto, un citoblasto mesenquimatoso, una célula de la médula ósea de las crestas ilíacas, o célula derivada de la placenta. Las células son capaces de auto-renovación y expansión en cultivo, y tienen el potencial de proliferar en células de otros fenotipos. También se proporcionan cultivos celulares terapéuticos que comprenden las células derivadas de tejido del cordón umbilical humano aisladas.

En otro de sus varios aspectos, la divulgación proporciona células derivadas de tejido del cordón umbilical humano aisladas capaces de auto-renovación y expansión en cultivo y que tienen el potencial de proliferar en células de otros fenotipos, en las que las células no estimulan linfocitos alógenos en una reacción de linfocitos mixtos, y expresa PD-L2, pero no HLA-G, CD178, HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86 o B7-H2. En algunas realizaciones preferidas, las células no estimulan CMSP alógenas. Más preferentemente, no estimulan linfocitos alógenos, linfocitos T alógenos, o linfocitos T sin tratamiento previo, o generan otras respuestas inmunológicas adversas en tanto receptores compatibles como incompatibles. Las células también pueden producir vimentina y alfa-actina de músculo liso en ciertas realizaciones.

En otro aspecto, la divulgación proporciona células derivadas del cordón umbilical humano aisladas que secretan uno o más de los factores angiogénicos MCP-1, IL-6, IL-8, GCP-2, HGF, KGF, FGF, HB-EGF, BDNF, TPO o TIMP1. En ciertas realizaciones, las células secretan varias o todas de las moléculas anteriormente mencionadas. En otras realizaciones de la divulgación, las células no secretan uno o más de los factores angiogénicos SDF-1alfa, TGF-beta2, ANG2, PDGFbb o VEGF, como se detecta por ELISA. En realizaciones particulares, secretan algunas o ninguna de aquellas moléculas.

En otro aspecto de la invención se proporcionan cultivos celulares terapéuticos, comprendiendo los cultivos celulares las células aisladas de la invención como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento de pacientes en necesidad de factores tróficos estimulantes de la angiogénesis. Tales cultivos celulares terapéuticos también se proporcionan para su uso en el tratamiento de un paciente en necesidad de factores tróficos estimulantes del crecimiento neural.

Se describen métodos de derivación de células de tejido del cordón umbilical humano no de sangre. Las células son capaces de auto-renovación y expansión en cultivo, y tienen el potencial de proliferar en células de otros fenotipos. El método comprende (a) obtener tejido umbilical humano; (b) eliminar sustancialmente toda la sangre para dar un tejido de cordón umbilical sustancialmente libre de sangre, (c) disociar el tejido por tratamiento mecánico o enzimático, o ambos, (d) resuspender el tejido en un medio de cultivo, y (e) proporcionar condiciones de crecimiento que permitan el crecimiento de una célula derivada de tejido del cordón umbilical humano capaz de auto-renovación y expansión en cultivo y que tiene el potencial de diferenciarse en células de otros fenotipos. Métodos preferidos implican tratamiento enzimático con, por ejemplo, colagenasa y dispasa, o colagenasa, dispasa, e hialuronidasa, y

tales métodos se proporcionan en el presente documento.

5 También se proporcionan en el presente documento células derivadas de tejido del cordón umbilical humano aisladas de la invención derivadas por el método anterior. Las células mantienen un cariotipo normal coherente a pesar de someterse a pases repetidos en ciertas realizaciones. También se proporcionan cultivos de células derivadas de tejido del cordón umbilical humano de la invención derivadas por el método anterior, en las que los cultivos están libres de células maternas.

10 También se proporcionan en el presente documento co-cultivos que comprenden las células o cultivos de la invención con otras células de mamífero. Preferentemente, estos co-cultivos comprenden otra línea celular humana cuyo crecimiento o potencial terapéutico, por ejemplo, mejora por la presencia de las células derivadas de tejido del cordón umbilical. Tales co-cultivos son útiles para aplicación terapéutica *in vitro* o *in vivo*.

15 En el presente documento también se proporcionan composiciones terapéuticas que comprenden una célula derivada de tejido del cordón umbilical y otro agente terapéutico, factor o agente bioactivo. Tales factores incluyen, pero no se limitan a, IGF, LIF, PDGF, EGF, FGF, además de agentes antitrombogénicos, antiapoptóticos, agentes antiinflamatorios, inmunosupresores o agentes inmunomoduladores, y antioxidantes. Tales composiciones terapéuticas pueden comprender además uno o más tipos adicionales de células, además de las UDC y el componente bioactivo.

20 Además de lo anterior, en el presente documento se desvelan composiciones derivadas de las células. Lisados celulares, fracciones celulares solubles y fracciones celulares enriquecidas en membrana se desvelan en el presente documento. También son útiles y se describen en el presente documento matrices extracelulares derivadas de las células, por ejemplo, que comprenden membranas basales.

25 Las composiciones de la divulgación también incluyen medios de cultivo acondicionados como se desvela en el presente documento. Tales medios se han usado por primera vez para cultivar las células o cultivos de la invención, que durante el crecimiento secretan uno o más productos útiles en el medio. El medio acondicionado de estas novedosas células es útil para muchos fines, que incluyen, por ejemplo, soportar el crecimiento de otras células de mamífero en necesidad de factores de crecimiento o factores tróficos secretados en los medios por las células y cultivos de la invención, y promover, por ejemplo, la angiogénesis.

30 Se proporcionan métodos de inducción de las células para diferenciarse a lo largo de una ruta hacia progenitores de diversas células, o incluso en las propias células terminalmente diferenciadas. Tales células tienen utilidad para el tratamiento terapéutico de ciertas afecciones, trastornos y estados de enfermedad. Tales células también tienen utilidad para protocolos de diagnóstico, tales como para su uso en ensayos para identificar agentes terapéuticos.

35 La invención también proporciona los progenitores de la invención para su uso en usos terapéuticos, que incluyen, pero no se limitan a, aplicación angiogénica, aplicaciones neuronales, aplicaciones de tejido blando, aplicaciones oculares y aplicaciones en las que las células son útiles en el tratamiento de corazón, riñón, hueso, cartílago, páncreas, hígado y otros tejidos solos o en combinación con otros agentes terapéuticos.

40 También se proporcionan kits en el presente documento. Se proporcionan kits útiles para el crecimiento, aislamiento y uso de las células derivadas de tejido del cordón umbilical.

45 Estos y otros aspectos de la invención se describirán en mayor detalle a continuación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

50 **Definiciones**

Diversos términos usados en toda la memoria descriptiva y reivindicaciones se definen como se expone a continuación.

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

60 Los citoblastos se clasifican según su potencial de desarrollo como: (1) *totipotentes*; (2) *pluripotentes*; (3) *multipotentes*; (4) *oligopotentes*; (5) *unipotentes*. Las células totipotentes son capaces de dar lugar a todas los tipos de células embrionarias y extraembrionarias. Las células pluripotentes son capaces de dar lugar a todos los tipos de células embrionarias. Las células multipotentes son capaces de dar lugar a un subconjunto de linajes celulares, pero

5 todos dentro de un tejido, órgano o sistema fisiológico particular (por ejemplo, los citoblastos hematopoyéticos (HSC) pueden producir progenie que incluye HSC (auto-renovación), progenitores oligopotentes limitados a células de la sangre, y todos los tipos de células y elementos (por ejemplo, plaquetas) que son componentes normales de la sangre). Las células que son oligopotentes pueden dar lugar a un subconjunto más limitado de linajes celulares que los citoblastos multipotentes; y las células que son unipotentes son capaces de dar lugar a un único linaje celular (por ejemplo, citoblastos espermatogénicos).

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

20 El *tejido embrionario* normalmente se define como tejido que se origina a partir del embrión (que en seres humanos se refiere al periodo desde la fecundación hasta aproximadamente seis semanas de desarrollo). *Tejido fetal* se refiere a tejido que se origina a partir del feto, que en seres humanos se refiere al periodo desde aproximadamente seis semanas de desarrollo hasta el parto. El *tejido extraembrionario* es tejido asociado a, pero que no se origina a partir del, embrión o feto. Los tejidos extraembrionarios incluyen membranas extraembrionarias (corión, amnios, saco vitelino y alantoides), cordón umbilical y placenta (que ella misma se forma a partir del corión y la decidua basal materna).

30 La *diferenciación* es el proceso por el que una célula sin especializar (“no comprometida”) o menos especializada adquiere las características de una célula especializada, tal como una célula nerviosa o una célula muscular, por ejemplo. Una célula *diferenciada* es una que ha aceptado una posición más especializada (“comprometida”) dentro del linaje de una célula. El término *comprometida*, cuando se aplica al proceso de diferenciación, se refiere a una célula que ha avanzado en la vía de diferenciación hasta un punto en el que, bajo circunstancias normales, continuará diferenciándose en un tipo de célula específico o subconjunto de tipos de células, y no puede, bajo circunstancias normales, diferenciarse en un tipo de célula diferente o volver a un tipo de célula menos diferenciado. La *des-diferenciación* se refiere al proceso por el que una célula vuelve a una posición menos especializada (o comprometida) dentro del linaje de una célula. Como se usa en el presente documento, el *linaje* de una célula define la herencia de la célula, es decir, de qué células procedió y a qué células puede dar lugar. El linaje de una célula pone a la célula dentro de un esquema hereditario de desarrollo y diferenciación.

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

50 Como se usa en el presente documento, la expresión *se diferencia en un linaje mesodérmico, ectodérmico o endodérmico* se refiere a una célula que se compromete a un linaje mesodérmico, ectodérmico o endodérmico específico, respectivamente. Ejemplos de células que se diferencian en un linaje mesodérmico o dan lugar a células mesodérmicas específicas incluyen, pero no se limitan a, células que son adipogénicas, condrogénicas, cardiogénicas, dermatogénicas, hematopoyéticas, hemangiogénicas, miogénicas, nefrogénicas, urogenitogénicas, osteogénicas, pericardiogénicas, o del estroma. Ejemplos de células que se diferencian en linaje ectodérmico incluyen, pero no se limitan a, células epidérmicas, células neurogénicas y células neurogliogénicas. Ejemplos de células que se diferencian en linaje endodérmico incluyen, pero no se limitan a, células pleurigénicas, células hepatogénicas, células que dan lugar al revestimiento del intestino, y células que dan lugar a células pancreogénicas y viscerogénicas.

60 Las células de la presente invención se denominan generalmente *células derivadas del cordón umbilical* (o *UDC*) o *células derivadas de tejido del cordón umbilical*. También pueden algunas veces denominarse más generalmente en el presente documento *células derivadas del posparto* o *células posparto* (*PPDC*). Además, las células pueden describirse como que son células madre no embrionarias o progenitoras no embrionarias, siendo el último término

usado en el sentido amplio.

El término *derivadas* se usa para indicar que las células han sido obtenidas de su fuente biológica y cultivadas o manipuladas de otro modo *in vitro* (por ejemplo, cultivadas en un medio de crecimiento para expandir la población y/o para producir una línea celular). Las manipulaciones *in vitro* de células madre no embrionarias del cordón umbilical y las características únicas de las células derivadas de tejido del cordón umbilical de la presente invención se describen en detalle más adelante.

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

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

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

Generalmente, un *factor trófico* se define como una sustancia que promueve o al menos soporta la supervivencia, crecimiento, proliferación y/o maduración de una célula, o estimula la elevada actividad de una célula.

Cuando se refiere a células de vertebrado cultivadas, el término *senescencia* (también *senescencia replicativa* o *senescencia celular*) se refiere a una propiedad atribuible a cultivos celulares finitos; concretamente, su incapacidad para crecer más allá de un número finito de duplicaciones de la población (algunas veces denominado *límite de Hayflick*). Aunque la senescencia celular se describió por primera vez usando células de tipo fibroblasto, la mayoría de los tipos de células humanas normales que pueden cultivarse satisfactoriamente en cultivo experimentan senescencia celular. La vida *in vitro* de diferentes tipos de células varía, pero la máxima vida normalmente es inferior a 100 duplicaciones de la población (esto es el número de duplicaciones para que todas las células en el cultivo se vuelvan senescentes y así hagan que el cultivo sea incapaz de dividirse). La senescencia no depende del tiempo cronológico, sino que se mide por el número de divisiones de las células, o duplicaciones de la población, que el cultivo ha experimentado. Así, las células hechas quiescentes eliminando factores de crecimiento esenciales pueden reanudar el crecimiento y división cuando los factores de crecimiento se re-introducen, y a partir de aquí llevar a cabo el mismo número de duplicaciones como células equivalentes cultivadas continuamente. Similarmente, cuando las células se congelan en nitrógeno líquido después de diversos números de duplicaciones de la población y luego se descongelan y se cultivan, experimentan sustancialmente el mismo número de duplicaciones que las células mantenidas sin congelar en cultivo. Las células senescentes no son células muertas o moribundas; son en realidad resistentes a la muerte celular programada (apoptosis), y se han mantenido en su estado no divisor durante nada menos que tres años. Estas células están mucho más vivas y metabólicamente activas, pero no se dividen. Todavía no se ha encontrado que el estado no divisor de las células senescentes sea reversible por cualquier agente biológico, químico o viral.

Como se usa en el presente documento, el término *medio de crecimiento* se refiere generalmente a un medio suficiente para el cultivo de células derivadas de tejido del cordón umbilical. En particular, un medio actualmente preferido para el cultivo de las células de la invención en el presente documento comprende medio esencial modificado por Dulbecco (también abreviado *DMEM* en el presente documento). Particularmente se prefiere *DMEM*-bajo en glucosa (también *DMEM-LG* en el presente documento) (Invitrogen, Carlsbad, CA). *DMEM*-bajo en glucosa se enriquece preferentemente con 15 % (v/v) de suero bovino fetal (por ejemplo, suero bovino fetal definido, Hyclone, Logan UT), antibióticos/antimicóticos (preferentemente penicilina (100 unidades/mililitro), estreptomina (100 miligramos/mililitro) y anfotericina B (0,25 microgramos/mililitro), (Invitrogen, Carlsbad, CA)) y 0,001 % (v/v) de

2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis MO). En algunos casos se usan medios de crecimiento diferentes, o se proporcionan enriquecimientos diferentes, y éstos normalmente se indican en el texto como enriquecimientos al medio de crecimiento.

5 También referente a la presente invención, el término *condiciones de crecimiento estándar*, como se usa en el presente documento, se refiere al cultivo de células a 37 °C, en una *atmósfera estándar* que comprende 5 % de CO₂. La humedad relativa se mantiene a aproximadamente el 100 %. Aunque las anteriores condiciones son útiles para el cultivo, debe entenderse que tales condiciones son capaces de ser variadas por el experto que apreciará las opciones disponibles en la materia para cultivar células, por ejemplo, variar la temperatura, CO₂, humedad relativa, oxígeno, medio de crecimiento y similares.

Las siguientes abreviaturas se usan en el presente documento:

15 *ANG2* (o *Ang2*) para angiopoyetina 2;
APC para células presentadoras de antígeno;
BDNF para factor neurotrófico derivado del cerebro;
bFGF para factor de crecimiento de fibroblastos básico;
bid (o *BID*) para “bis in die” (dos veces por día);
20 *BSP* para sialoproteína ósea;
CK18 para citoqueratina 18;
ligando 3 de CXC para ligando 3 del receptor de quimiocinas;
DAPI para 4',6-diamidino-2-fenilindol-2HCl;
DMEM para medio esencial mínimo de Dulbecco;
DMEM:lg (o *DMEM:Lg*, *DMEM:LG*) para DMEM con baja glucosa;
25 *EDTA* para ácido etilendiaminatetraacético;
EGF para factor de crecimiento epidérmico;
ERG PARA ELECTRORETINALGRAMA;
FACS para citometría de flujo activada por fluorescencia;
FBS para suero bovino fetal;
30 *GCP-2* para proteína 2 quimiotáctica de granulocitos;
GFAP para proteína ácida fibrilar de la glía;
HB-EGF para factor de crecimiento epidérmico de unión a la heparina;
HCAEC para células endoteliales de la arteria coronaria humanas;
HGF para factor de crecimiento de hepatocitos;
35 *hMSC* para citoblastos mesenquimatosos humanos;
HNF-1 alfa para factor de transcripción específico de hepatocitos;
HUVEC para células endoteliales de la vena umbilical humanas;
I309 para una quimiocina y el ligando para el receptor CCR8 y es responsable de la quimioatracción de linfocitos T tipo TH2. I309 se une a células endoteliales, estimula la quimiotaxia e invasión de estas células, y potencia la diferenciación de HUVEC en estructuras tipo capilar en un ensayo Matrigel *in vitro*. Además, I309 es un inductor de la angiogénesis *in vivo* en tanto la córnea de conejo como el ensayo de membrana corioalantoidea de pollito (CAM).
40 *IL-6* para interleucina-6;
IL-8 para interleucina 8;
45 *K19* para queratina 19;
K8 para queratina 8;
KGF para factor de crecimiento de queratinocitos;
MCP-1 para proteína 1 quimiotáctica de monocitos;
MDC para quimiocina derivada de macrófagos;
50 *MIP1alfa* para proteína 1 alfa inflamatoria de macrófagos;
MIP1beta para proteína 1 beta inflamatoria de macrófagos;
MSC para citoblastos mesenquimatosos;
NHDF para fibroblastos dérmicos humanos normales;
NPE para medios de expansión de progenitores neurales;
55 *PBMC* para célula mononuclear de sangre periférica;
PBS para solución salina tamponada con fosfato;
PDGFbb para factor de crecimiento derivado de plaquetas;
PDGFr/alfa para receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas;
PD-L2 para ligando 2 de muerte programada;
60 *PE* para ficoeritrina;
PO para “per os” (por la boca);
PPDC para célula derivada del posparto;
Rantes (o *RANTES*) para expresada y secretada por linfocitos T normales regulados tras la activación;
rhGDF-5 para factor de crecimiento y diferenciación 5 humano recombinante;
65 *SC* para subcutáneamente;
SDF-1alfa para factor 1 alfa derivado del estroma;

SHH para erizo sónico;
SOP para procedimiento de operación estándar;
TARC para quimiocina del timo y regulada por la activación;
TCP para plástico de cultivo de tejido;
TGFbeta2 para factor de crecimiento transformante beta2;
TGFbeta-3 para factor de crecimiento transformante beta-3;
TIMP1 para tejido inhibidor de la metaloproteínasa de matriz 1;
TPO para trombopoyetina;
TuJ1 para tubulina BIII;
UDC para célula derivada del cordón umbilical;
VEGF para factor de crecimiento endotelial vascular;
vWF para factor de von Willebrand;
alfaFP para alfa-fetoproteína;

15 **Descripción**

En un primer aspecto, la invención proporciona una célula aislada obtenible de tejido del cordón umbilical humano, en la que dicho tejido del cordón umbilical humano está sustancialmente libre de sangre, dicha célula es capaz de auto-renovación y expansión en cultivo y tiene el potencial de diferenciarse en células de otros fenotipos, dicha célula es capaz de expandirse en presencia de oxígeno de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 20 %, dicha célula requiere L-valina para el crecimiento, y en la que dicha célula tiene las siguientes características:

- a. potencial de experimentar al menos 40 duplicaciones en cultivo;
- b. unión y expansión sobre un recipiente de cultivo de tejido recubierto o sin recubrir, en la que el recipiente de cultivo de tejido recubierto comprende un recubrimiento de gelatina, laminina, colágeno, poliornitina, vitronectina o fibronectina;
- c. producción de vimentina y alfa-actina de músculo liso;
- d. producción de los marcadores de la superficie celular CD10, CD13, CD44, CD73, HLA-A,B,C, CD90 y PDGFr-alfa, como se detecta por citometría de flujo;
- e. elevada expresión de genes endógenos que codifican interleucina 8, reticulón 1, ligando 1 de quimiocinas (motivo C-X-C) (actividad estimulante del crecimiento de melanoma, alfa); ligando 6 de quimiocinas (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica de granulocitos); ligando 3 de quimiocinas (motivo C-X-C); proteína 3 inducida por factor de necrosis tumoral alfa, con respecto a la expresión endógena de interleucina 8, reticulón 1, ligando 1 de quimiocinas (motivo C-X-C) (actividad estimulante del crecimiento de melanoma, alfa); ligando 6 de quimiocinas (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica de granulocitos); ligando 3 de quimiocinas (motivo C-X-C); proteína 3 inducida por factor de necrosis tumoral alfa en una célula humana que es un fibroblasto, un citoblasto mesenquimatoso, o una célula de la médula ósea de las crestas ilíacas, como se caracteriza por matriz de oligonucleótidos;
- f. ausencia de producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ, como se detecta por citometría de flujo;
- g. secreción de MCP-1, IL-6, GCP-2, IL-8, TIMP1, TPO, KGF, HGF, FGF, HBEGF, BDNF e IL-8, como se detecta por ELISA;
- h. ausencia de secreción de SDF-1alfa, VEGF, TGF-beta2, ANG2 y PDGFbb, como se detecta por ELISA;
- i. ausencia de expresión de CD80, CD86, B7-H2, HLA-G y CD178, como se detecta por citometría de flujo;
- j. expresión de PD-L2, como se detecta por citometría de flujo; y
- k. una disminución en la expresión de los siguientes genes con respecto a una célula humana que es un fibroblasto, un citoblasto mesenquimatoso, o una cresta ilíaca, como se caracteriza por matriz de oligonucleótidos: homeocaja 2 de baja estatura; proteína 2 de 27 kDa de choque térmico; ligando 12 de quimiocinas (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células del estroma); elastina; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); homeocaja 2 del mesénquima; homólogo 1 de la homeocaja del seno ocular; cristalina, alfa B; activador asociado a dishevelled de la morfogénesis 2; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralina 1; tetranectina; dominio de homología tres con src (SH3) y rico en cisteína; gen 1 de translocalización de linfocitos B, antiproliferativo; 25-hidroxisilasa del colesterol; factor de transcripción 3 relacionado con runt; proteína hipotética FLJ23191; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de la procolágeno C-endopeptidasa; homólogo 7 de frizzled; gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C; proteína 5 de la homeocaja de iroquois; hefaestina; integrina, beta 8; glicoproteína 2 de las vesículas sinápticas; ADNc FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor 1 de tipo receptor de citocinas; canal de potasio activado por calcio de conductancia intermedia/pequeña, subfamilia N, miembro 4; integrina, alfa 7; proteína DKFZP586L151; co-activador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ); homólogo 2 de la homeocaja del seno ocular; proteína KIAA1034; respuesta 3 de crecimiento temprano; homeocaja 5 distal-less; proteína hipotética FLJ20373; familia 1 de la aldo-ceto reductasa, miembro C3 (3-alfa hidroxisteroide deshidrogenasa, tipo II); biglicano; fibronectina 1; proencefalina; integrina, 1 similar a beta (con dominios de repetición similares a EGF); clon de ADNc EUROIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor C del péptido natriurético/guanilato ciclasa C (receptor C del péptido atrionatriurético); proteína hipotética FLJ14054; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222); proteína 5 de la membrana asociada a vesícula; proteína de la matriz extracelular 1 similar a fibulina que contiene EGF; tipo 3 de

proteína de 19 kDa de interacción BCL2/adenovirus E1B; proteína 1 de unión de AE; polipéptido 1 de la subunidad VIIa de la citocromo c oxidasa (músculo); neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; y factor de crecimiento similar a la proteína de unión a la insulina 2, 36 kDa.

5 Las células son capaces de auto-renovación y expansión en cultivo. Las células derivadas de tejido del cordón umbilical tienen el potencial de proliferar en células de otros fenotipos. En realizaciones preferidas, las células pueden diferenciarse en cualquier célula de origen ectodérmico, mesodérmico o endodérmico. Las células se aíslan de tejidos del cordón umbilical humano. Las células, como se ha desvelado en el presente documento, no se derivan preferentemente de sangre del cordón umbilical. Ni son células endoteliales derivadas de, por ejemplo, vasos
10 sanguíneos. Más bien, las células se derivan de los restantes tejidos del cordón umbilical.

Las células se han caracterizado en cuanto a varias de sus propiedades celulares, genéticas, inmunológicas y bioquímicas. Por ejemplo, las células se han caracterizado bien por sus marcadores de la superficie celular, por su expresión génica, por su capacidad para producir ciertos factores tróficos bioquímicos y por sus propiedades
15 inmunológicas.

En otro de sus varios aspectos se proporcionan cultivos celulares que comprenden las células derivadas de tejido del cordón umbilical aisladas de la invención. Los cultivos están libres de células maternas en realizaciones preferidas en el presente documento. También se prefieren células que tengan un cariotipo normal, y aquellas que mantengan su cariotipo cuando se someten a pases. Las más altamente preferidas son aquellas células que tienen y mantienen un cariotipo normal a través de los pases hasta al menos después de la senescencia.

Se proporcionan métodos de cultivo y expansión de células derivadas de tejido del cordón umbilical y cultivos celulares que las comprenden. Presentemente se prefieren células que no requieran factores de crecimiento añadidos, sino que sean capaces de expansión en muchos medios de cultivo disponibles, especialmente aquellos enriquecidos con, por ejemplo, suero bovino fetal. Medios preferidos para el cultivo y expansión de las células incluyen medio de crecimiento, definido en el presente documento como medio que comprende medio esencial modificado por Dulbecco (también abreviado *DMEM* en el presente documento). Se prefiere *DMEM*-bajo en glucosa (también *DMEM-LG* en el presente documento) (Invitrogen, Carlsbad, CA). *DMEM*-bajo en glucosa se enriquece lo más preferentemente con 15 % (v/v) de suero bovino fetal (por ejemplo, suero bovino fetal definido, Hyclone, Logan UT), antibióticos/antimicóticos (preferentemente penicilina a 100 unidades/mililitro, estreptomycin a 100 microgramos/mililitro y anfotericina B a 0,25 microgramos/mililitro; (Invitrogen, Carlsbad, CA)), y 0,001 % (v/v) de 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis MO).

35 El experto apreciará que el medio de crecimiento puede enriquecerse y alterarse de diversas maneras en cualquiera de las formas conocidas en la técnica, y puede optimizarse por motivos particulares. Además, las células son capaces de crecer en muchos otros medios de cultivo, que incluyen medios químicamente definidos en ausencia de suero añadido. Varios de tales medios se ejemplifican más adelante. Además del cultivo y mantenimiento rutinario de las células, en la técnica se conocen muchos otros medios para afectar la diferenciación de tales células potentes
40 en tipos específicos de células o progenitores de células específicas. El experto apreciará que estos medios son útiles para muchos fines, y están incluidos dentro del alcance de la invención, pero no son necesariamente preferidos para cultivo y expansión rutinario.

Además de la flexibilidad de las células con respecto al medio de cultivo, las células pueden crecer bajo una variedad de condiciones medioambientales. En particular, las células pueden crecer bajo un amplio intervalo de condiciones atmosféricas. Presentemente se prefieren atmósferas que oscilan de aproximadamente 5 % de O₂ a aproximadamente 20 % o más de O₂. Las células crecen y se expanden bien en medio de crecimiento bajo estas condiciones, normalmente en presencia de aproximadamente 5 % de CO₂, y el resto de la atmósfera como nitrógeno. El experto apreciará que las células pueden tolerar intervalos más amplios de condiciones en diferentes
50 medios, y que puede ser apropiada la optimización para fines específicos.

Aunque las células no han demostrado ningún requisito para factores de crecimiento específicos, las células han demostrado un requisito para L-valina con respecto a D-valina. Así, medios de cultivo preferidos deben tener el isómero L de este aminoácido presente. Además de la flexibilidad demostrada de las células con respecto a sus requisitos de crecimiento, se prefieren células aisladas que puedan unirse y expandirse sobre tanto un recipiente de cultivo de tejido recubierto como sin recubrir. Los recipientes de cultivo de tejido incluyen placas, matraces, tubos y similares, hechos de cualquiera de los materiales conocidos en la técnica - por ejemplo, plástico, poliestireno, vidrio. Tales recipientes, si están recubiertos, están recubiertos con cualquiera de una variedad de compuestos como se conoce en la técnica. Los recipientes recubiertos actualmente preferidos comprenden un recubrimiento con, por ejemplo, gelatina, laminina, colágeno, poliornitina, polilisina, vitronectina o fibronectina.

Las células aisladas de la invención también se expanden preferentemente en presencia de aproximadamente 2 % a aproximadamente 15 % de suero, preferentemente suero bovino fetal, y más preferentemente suero bovino fetal definido. Las células también se expanden en presencia o ausencia de beta-mercaptoetanol, y en presencia o ausencia de factores de crecimiento añadidos que incluyen uno o más de EGF, bFGF, PDGF, VEGF, IGF-I y LIF. El experto apreciará que estos requisitos de crecimiento flexibles permiten muchas opciones cuando se cultiva o
65

trabaja con estas células. En ciertas realizaciones, las células se cultivan en Advanced DMEM (Gibco) que contiene uno cualquiera de los factores de crecimiento previamente mencionados, particularmente bFGF. Como se ha descrito anteriormente, aunque actualmente se prefiere medio de crecimiento, no hay requisito absoluto para el suero; el crecimiento se ha llevado a cabo en medio sin suero.

5 En una realización preferida, las células tienen excelente potencial de duplicación y expansión y son adecuadas para su uso en aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas debido a que sus números pueden aumentarse de escala fácilmente. Las células aisladas pueden preferentemente duplicarse suficientemente para generar rendimientos superiores a aproximadamente 10^{14} células en menos de aproximadamente 80 días en cultivo cuando se siembran a aproximadamente 10^3 células/cm² en un medio adecuado. Son más preferidas células que pueden duplicarse suficientemente para generar más de aproximadamente 10^{15} células en menos de aproximadamente 80 días en cultivo cuando se siembran a aproximadamente 5.000 células/cm². Es todavía más preferida la célula aislada que puede duplicarse suficientemente para generar más de aproximadamente 10^{17} células en menos de aproximadamente 65 días en cultivo cuando se siembra a aproximadamente 5.000 células/cm².

15 Las células aisladas de la invención pueden someterse a amplias duplicaciones. Preferentemente, las células se someten a al menos 30 duplicaciones antes alcanzar la senescencia. Más preferentemente, son obtenibles al menos 40 duplicaciones en cultivo. Son todavía más preferibles aquellas células que pueden alcanzar más de 40 duplicaciones antes de convertirse en senescentes. Las células de la invención son preferentemente capaces de someterse a división durante un periodo de tiempo más largo que, por ejemplo, células mesenquimatosas humanas, o fibroblastos humanos, cultivados bajo las mismas condiciones.

25 En una realización, las células derivadas de tejido del cordón umbilical se aíslan en presencia de una o más actividades de enzima. Se conocen en la técnica una amplia gama de enzimas digestivas para su uso en el aislamiento de células de tejido, que incluyen enzimas que varían de aquellas consideradas débilmente digestivas (por ejemplo, desoxirribonucleasas y la proteasa neutra, dispasa) a fuertemente digestivas (por ejemplo, papaína y tripsina). Actualmente se prefieren actividades de enzimas mucolíticas, metaloproteasas, proteasas neutras, serina proteasas (tales como tripsina, quimotripsina o elastasa) y desoxirribonucleasas. Son más preferidas actividades de enzima seleccionadas de metaloproteasas, proteasas neutras y actividades mucolíticas. Actualmente se prefieren células que se aíslan en presencia de una o más actividades de colagenasa, hialuronidasa y dispasa. Son más preferidas aquellas células aisladas en presencia de una colagenasa de *Clostridium histolyticum*, y cualquiera de las actividades de proteasa, dispasa y termolisina. Son todavía más preferidas las células aisladas con actividades de enzima colagenasa y dispasa. También se prefieren tales células aisladas en presencia de una actividad de hialuronidasa, además de actividad de colagenasa y dispasa.

35 En otro aspecto de la invención se proporcionan células derivadas de tejido del cordón umbilical aisladas que tienen perfiles de expresión de marcadores de la superficie celular específicos. Las células preferidas de la divulgación se caracterizan en tanto su producción como ausencia de producción de uno o más marcadores de la superficie celular seleccionados de CD10, CD13, CD31, CD44, CD45, CD73, CD90, CD 117, CD141, PDGFr-alfa, HLA-A,B,C y HL-DR,DP,DQ. Las células más preferidas de la divulgación son células que se caracterizan con respecto a su producción, o carecen de la misma, de varios (por ejemplo, dos, cuatro, cinco u ocho), o incluso diez de, o todos de, los anteriores, para proporcionar un perfil de la célula. En realizaciones preferidas de la divulgación, las células producen uno o más de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa o HLA-A,B,C. Son más preferidas las células que expresan varios o todos de los marcadores anteriores. Las células de la invención expresan cada uno de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C.

50 Las células preferidas también pueden caracterizarse con respecto a marcadores que no producen, y tal información también es útil en la formación de una caracterización o perfil inmunológico de la célula. Las células de la invención no producen CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 o HLA-DR,DP,DQ, como se detecta por citometría de flujo.

55 En otras realizaciones preferidas de la divulgación, puede mostrarse que las células producen varios o más de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C y concomitantemente no producen uno, o varios, o más de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 o HLA-DR,DP,DQ, como se detecta por citometría de flujo. Las células de la invención producen cada uno de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C y concomitantemente no producen ninguno de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 o HLA-DR,DP,DQ, como se detecta por citometría de flujo.

60 Tales células están altamente caracterizadas con respecto a su producción de estas proteínas de la superficie celular. En realizaciones preferidas, la caracterización de las células con respecto a tal producción sigue sustancialmente constante y no cambia sustancialmente con variaciones en el procedimiento de aislamiento, pase, condiciones de cultivo, o incluso el recubrimiento o ausencia del mismo sobre un recipiente de cultivo de tejido.

65 Las células de la invención también se han caracterizado según su expresión de una amplia variedad de genes. Por consiguiente, otro aspecto de la divulgación proporciona células derivadas del cordón umbilical humano aisladas, que se caracterizan, con respecto a una célula humana que es un fibroblasto, un citoblasto mesenquimatoso, o una célula de la médula ósea de las crestas ilíacas, en su expresión de genes para: homeocaja 2 de baja estatura;

5 proteína 2 de 27 kDa de choque térmico; ligando 12 de quimiocinas (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células del estroma); elastina (estenosis aórtica supra-avalvular, síndrome de Williams-Beuren); ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); homeocaja 2 del mesénquima (homeocaja específica de la detención del crecimiento); homólogo 1 de la homeocaja del seno ocular (*Drosophila*); cristalina, alfa B; activador asociado a dishevelled de la morfogénesis 2; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralina 1; tetranectina (proteína de unión al plasminógeno); dominio de homología tres con src (SH3) y rico en cisteína; gen 1 de translocalización de linfocitos B, antiproliferativo; 25-hidroxilasa del colesterol; factor de transcripción 3 relacionado con runt; proteína hipotética FLJ23191; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de la procolágeno C-endopeptidasa; homólogo 7 de frizzled (*Drosophila*); gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C (hexabraquiona); proteína 5 de la homeocaja de iroquois; hefaestina; integrina, beta 8; glucoproteína 2 de las vesículas sinápticas; ADNc de *Homo sapiens* FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor 1 de tipo receptor de citocinas; canal de potasio activado por calcio de conductancia intermedia/pequeña, subfamilia N, miembro 4; integrina, alfa 7; proteína DKFZP586L151; co-activador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ); homólogo 2 de la homeocaja del seno ocular (*Drosophila*); proteína KIAA1034; respuesta 3 de crecimiento precoz; homeocaja 5 de distal-less; proteína hipotética FLJ20373; familia 1 de la aldo-ceto reductasa, miembro C3 (3-alfa-hidroxiesteroide deshidrogenasa, tipo II); biglicano; fibronectina 1; proencefalina; integrina, 1 similar a beta (con dominios de repetición similares a EGF); inserto de longitud completa de ARNm de *Homo sapiens*; clon de ADNc EUROIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor C del péptido natriurético/guanilato ciclasa C (receptor C del péptido atrionatriurético); proteína hipotética FLJ14054; ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222); proteína 5 de la membrana asociada a vesículas (miobrevina); proteína de la matriz extracelular 1 similar a fibulina que contiene EGF; tipo 3 de proteína de 19 kDa de interacción BCL2/adenovirus E1B; proteína 1 de unión a AE; polipéptido 1 de la subunidad VIIa de la citocromo c oxidasa (músculo); neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; factor de crecimiento similar a la proteína de unión a la insulina 2, 36 kDa; además de interleucina 8; reticulón 1; ligando 1 de quimiocinas (motivo C-X-C) (actividad estimulante del crecimiento de melanoma, alfa); ligando 6 de quimiocinas (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica de granulocitos); ligando 3 de quimiocinas (motivo C-X-C); y factor de necrosis tumoral, proteína 3 inducida por alfa.

30 En una realización de la divulgación, las células preferidas tienen la caracterización de marcador de la superficie celular descrita anteriormente y se caracterizan adicionalmente en su expresión génica relativa. Por ejemplo, algunas células preferidas tienen la caracterización de superficie celular descrita anteriormente y expresan un gen para uno o más de interleucina 8; reticulón 1; ligando 1 de quimiocinas (motivo C-X-C) (actividad estimulante del crecimiento de melanoma, alfa); ligando 6 de quimiocinas (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica de granulocitos); ligando 3 de quimiocinas (motivo C-X-C); o factor de necrosis tumoral, proteína 3 inducida por alfa. Son más preferidas aquellas células que expresan un gen para varios (por ejemplo, al menos dos, cuatro, cinco o más) de cada uno de los anteriores. Las células son capaces de auto-renovación y expansión en cultivo, y tienen el potencial de proliferar en células de otros fenotipos. También se proporcionan cultivos celulares terapéuticos que comprenden las células derivadas de tejido del cordón umbilical humano aisladas.

40 También se describen UDC que comprenden la caracterización de marcador de la superficie celular y que con respecto a una célula humana que es un fibroblasto, un citoblasto mesenquimatoso, o una célula de la médula ósea de las crestas ilíacas, tienen expresión reducida de uno o más genes seleccionados de: homeocaja 2 de baja estatura; proteína 2 de 27 kDa de choque térmico; ligando 12 de quimiocinas (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células del estroma); elastina (estenosis aórtica supra-avalvular, síndrome de Williams-Beuren); ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); homeocaja 2 del mesénquima (homeocaja específica de la detención del crecimiento); homólogo 1 de la homeocaja del seno ocular (*Drosophila*); cristalina, alfa B; activador asociado a dishevelled de la morfogénesis 2; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralina 1; tetranectina (proteína de unión al plasminógeno); dominio de homología tres con src (SH3) y rico en cisteína; gen 1 de translocalización de linfocitos B, antiproliferativo; 25-hidroxilasa del colesterol; factor de transcripción 3 relacionado con runt; proteína hipotética FLJ23191; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de la procolágeno C-endopeptidasa; homólogo 7 de frizzled (*Drosophila*); gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C (hexabraquiona); proteína 5 de la homeocaja de iroquois; hefaestina; integrina, beta 8; glucoproteína 2 de las vesículas sinápticas; ADNc de *Homo sapiens* FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor 1 de tipo receptor de citocinas; canal de potasio activado por calcio de conductancia intermedia/pequeña, subfamilia N, miembro 4; integrina, alfa 7; proteína DKFZP586L151; co-activador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ); homólogo 2 de la homeocaja del seno ocular (*Drosophila*); proteína KIAA1034; respuesta 3 de crecimiento precoz; homeocaja 5 de distal-less; proteína hipotética FLJ20373; familia 1 de la aldo-ceto reductasa, miembro C3 (3-alfa-hidroxiesteroide deshidrogenasa, tipo II); biglicano; fibronectina 1; proencefalina; integrina, 1 similar a beta (con dominios de repetición similares a EGF); inserto de longitud completa de ARNm de *Homo sapiens*; clon de ADNc EUROIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor C del péptido natriurético/guanilato ciclasa C (receptor C del péptido atrionatriurético); proteína hipotética FLJ14054; ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222); proteína 5 de la membrana asociada a vesículas (miobrevina); proteína de la matriz extracelular 1 similar a fibulina que contiene EGF; tipo 3 de proteína de 19 kDa de interacción BCL2/adenovirus E1B; proteína 1 de unión a AE; polipéptido 1 de la subunidad VIIa de la citocromo c oxidasa (músculo); neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; factor de crecimiento similar a la proteína de unión a la insulina 2, 36 kDa. Se prefieren células que tienen expresión reducida de un gen para varios (por ejemplo, al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más, o incluso todos) de los anteriores.

Células todavía más altamente preferidas de la divulgación son aquellas células que tienen la caracterización de marcador de la superficie celular como se describe en el presente documento anteriormente y que también expresan un gen para cada uno de interleucina 8; reticulón 1; ligando 1 de quimiocinas (motivo C-X-C) (actividad estimulante del crecimiento de melanoma, alfa); ligando 6 de quimiocinas (motivo C-X-C) (granulocito); ligando 3 de quimiocinas (motivo C-X-C); o factor de necrosis tumoral, proteína 3 inducida por alfa, y que con respecto a una célula humana que es un fibroblasto, un citoblasto mesenquimatoso, o una célula de la médula ósea de las crestas ilíacas, tienen expresión reducida de uno o más genes seleccionados de: homeocaja 2 de baja estatura; proteína 2 de 27 kDa de choque térmico; ligando 12 de quimiocinas (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células del estroma); elastina (estenosis aórtica supravulvar, síndrome de Williams-Beuren); ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); homeocaja 2 del mesénquima (homeocaja específica de la detención del crecimiento); homólogo 1 de la homeocaja del seno ocular (*Drosophila*); cristalina, alfa B; activador asociado a dishevelled de la morfogénesis 2; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralina 1; tetranectina (proteína de unión al plasminógeno); dominio de homología tres con src (SH3) y rico en cisteína; gen 1 de translocalización de linfocitos B, antiproliferativo; 25-hidroxilasa del colesterol; factor de transcripción 3 relacionado con runt; proteína hipotética FLJ23191; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de la procolágeno C-endopeptidasa; homólogo 7 de frizzled (*Drosophila*); gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C (hexabraquiona); proteína 5 de la homeocaja de iroquois; hefaestina; integrina, beta 8; glucoproteína 2 de las vesículas sinápticas; ADNc de *Homo sapiens* FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor 1 de tipo receptor de citocinas; canal de potasio activado por calcio de conductancia intermedia/pequeña, subfamilia N, miembro 4; integrina, alfa 7; proteína DKFZP586L151; co-activador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ); homólogo 2 de la homeocaja del seno ocular (*Drosophila*); proteína KIAA1034; respuesta 3 de crecimiento precoz; homeocaja 5 de distal-less; proteína hipotética FLJ20373; familia 1 de la aldo-ceto reductasa, miembro C3 (3-alfa-hidroxiesteroide deshidrogenasa, tipo II); biglicano; fibronectina 1; proencefalina; integrina, 1 similar a beta (con dominios de repetición similares a EGF); inserto de longitud completa de ARNm de *Homo sapiens*; clon de ADNc EUROIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor C del péptido natriurético/guanilato ciclasa C (receptor C del péptido atrionatriurético); proteína hipotética FLJ14054; ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222); proteína 5 de la membrana asociada a vesículas (miobrevina); proteína de la matriz extracelular 1 similar a fibulina que contiene EGF; tipo 3 de proteína de 19 kDa de interacción BCL2/adenovirus E1B; proteína 1 de unión a AE; polipéptido 1 de la subunidad VIIa de la citocromo c oxidasa (músculo); neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; factor de crecimiento similar a la proteína de unión a la insulina 2, 36 kDa.

En otro de sus aspectos, la divulgación proporciona células derivadas de tejido del cordón umbilical humano aisladas que con respecto a una célula humana que es un fibroblasto, un citoblasto mesenquimatoso, o una célula de la médula ósea de las crestas ilíacas, tienen expresión reducida de genes para cada uno de: homeocaja 2 de baja estatura; proteína 2 de 27 kDa de choque térmico; ligando 12 de quimiocinas (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células del estroma); elastina (estenosis aórtica supravulvar, síndrome de Williams-Beuren); ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); homeocaja 2 del mesénquima (homeocaja específica de la detención del crecimiento); homólogo 1 de la homeocaja del seno ocular (*Drosophila*); cristalina, alfa B; activador asociado a dishevelled de la morfogénesis 2; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralina 1; tetranectina (proteína de unión al plasminógeno); dominio de homología tres con src (SH3) y rico en cisteína; gen 1 de translocalización de linfocitos B, antiproliferativo; 25-hidroxilasa del colesterol; factor de transcripción 3 relacionado con runt; proteína hipotética FLJ23191; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de la procolágeno C-endopeptidasa; homólogo 7 de frizzled (*Drosophila*); gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C (hexabraquiona); proteína 5 de la homeocaja de iroquois; hefaestina; integrina, beta 8; glucoproteína 2 de las vesículas sinápticas; ADNc de *Homo sapiens* FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor 1 de tipo receptor de citocinas; canal de potasio activado por calcio de conductancia intermedia/pequeña, subfamilia N, miembro 4; integrina, alfa 7; proteína DKFZP586L151; co-activador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ); seno ocular; homólogo 2 de la homeocaja (*Drosophila*); proteína KIAA1034; respuesta 3 de crecimiento precoz; homeocaja 5 de distal-less; proteína hipotética FLJ20373; familia 1 de la aldo-ceto reductasa, miembro C3 (3-alfa-hidroxiesteroide deshidrogenasa, tipo II); biglicano; fibronectina 1; proencefalina; integrina, 1 similar a beta (con dominios de repetición similares a EGF); inserto de longitud completa de ARNm de *Homo sapiens*; clon de ADNc EUROIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor C del péptido natriurético/guanilato ciclasa C (receptor C del péptido atrionatriurético); proteína hipotética FLJ14054; ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222); proteína 5 de la membrana asociada a vesículas (miobrevina); proteína de la matriz extracelular 1 similar a fibulina que contiene EGF; tipo 3 de proteína de 19 kDa de interacción BCL2/adenovirus E1B; proteína 1 de unión a AE; polipéptido 1 de la subunidad VIIa de la citocromo c oxidasa (músculo); neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; factor de crecimiento similar a la proteína de unión a la insulina 2, 36 kDa; y que expresan un gen para cada uno de interleucina 8; reticulón 1; ligando 1 de quimiocinas (motivo C-X-C) (actividad estimulante del crecimiento de melanoma, alfa); ligando 6 de quimiocinas (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica de granulocitos); ligando 3 de quimiocinas (motivo C-X-C); y factor de necrosis tumoral, proteína 3 inducida por alfa, en las que la expresión es elevada con respecto a la de una célula humana que es un fibroblasto, un citoblasto mesenquimatoso, una célula de la médula ósea de las crestas ilíacas, o célula derivada de la placenta. Tales células no necesitan caracterizarse con respecto a sus marcadores de la superficie celular, pero tales células son preferentemente capaces de auto-renovación y expansión in cultivo y también tienen la capacidad de diferenciarse en cultivo. Son más preferidas las células que se aíslan como células adherentes como se describe más adelante, sin embargo, tales células también puede cultivarse después del aislamiento en una forma esférica bajo ciertas

condiciones, así no son obligatoriamente adherentes.

Ciertas realizaciones preferidas de la divulgación incluyen células como se ha descrito anteriormente que también producen vimentina o alfa-actina de músculo liso. Las células de la invención producen tanto vimentina como alfa-actina de músculo liso. La producción de estas proteínas parece distinguir las células de la presente invención de células hematopoyéticas aisladas de, por ejemplo, sangre del cordón umbilical.

En realizaciones preferidas, los perfiles de expresión génica anteriores son sustancialmente estables y no varían con los pases o condiciones de cultivo normales. Por supuesto, se entiende que un perfil tal puede variar cuando las células se cultivan en condiciones que estimulan o inducen la diferenciación en otros fenotipos, por ejemplo, o la expresión de un conjunto diferente de genes.

La invención también proporciona cultivos celulares terapéuticos que comprenden la célula según la reivindicación 1. Los bancos de células que comprenden cultivos terapéuticos están similarmente incluidos en el alcance de la invención. Por ejemplo, un banco de células puede incluir células cultivadas de la invención a diversos pases, además de células de la invención que han sido inducidas para diferenciarse en diferentes fenotipos. Otras células pueden guardarse satisfactoriamente en bancos tanto por separado como en co-cultivo con las células de la invención. Un banco de células completo puede incluir las células guardadas en el banco de una amplia variedad de individuos. En realizaciones preferidas, las células guardadas en el banco se guardan criopreservadas a, por ejemplo, -180 °C. Las células se guardan preferentemente a -90 °C en algunas realizaciones. Las células de la invención se criopreservan fácilmente bajo una variedad de condiciones, tal como se conoce en la técnica.

En realizaciones preferidas, las células carecen de las moléculas de la superficie celular requeridas para estimular sustancialmente linfocitos alógenos en una reacción de linfocitos mixtos. En realizaciones más preferidas, las células carecen de las moléculas de la superficie requeridas para estimular sustancialmente linfocitos T CD4⁺ en evaluaciones *in vitro*, o *in vivo*, en receptores alógenos, singénicos o autólogos. Son todavía más preferidas aquellas células que no producen ninguna consecuencia inmunológica adversa sustancial para aplicaciones *in vivo*. En algunas realizaciones de la divulgación, los cultivos celulares terapéuticos carecen de cantidades detectables de al menos dos, o varias, o todas las proteínas estimulantes HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86 y B7-H2, como se ha determinado por citometría de flujo. Son más preferidos aquellos que carecen de todas las anteriores. También se prefieren cultivos celulares terapéuticos que carecen adicionalmente de cantidades detectables de una o ambas de las proteínas inmunomoduladoras HLA-G y CD178, como se ha determinado por citometría de flujo. También se prefieren cultivos celulares terapéuticos que expresan cantidades detectables de la proteína inmunomoduladora PD-L2, como se ha determinado por citometría de flujo. En una realización, el cultivo celular terapéutico no estimula sustancialmente una respuesta mediada por linfocitos *in vitro*, en comparación con controles alógenos en una reacción de linfocitos mixtos.

En otro de sus varios aspectos, la invención proporciona células derivadas del cordón umbilical humano aisladas de la invención capaces de auto-renovación y expansión en cultivo y que tienen el potencial de proliferar en células de otros fenotipos, en las que las células no estimulan sustancialmente linfocitos alógenos en una reacción de linfocitos mixtos. Son más preferidas las células que no estimulan sustancialmente linfocitos T CD4⁺, y que producen PD-L2, pero no ninguno de HLA-G, CD178, HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86 y B7-H2.

Actualmente se prefieren células de la invención que secretan moléculas útiles, por ejemplo, factores de crecimiento. Tales células tienen utilidad no solo por sus propiedades celulares, sino por sus moléculas secretadas, por ejemplo, en medio acondicionado, o lisados libres de células. En otro aspecto, la divulgación proporciona células derivadas del cordón umbilical humano aisladas que secretan uno o más de los factores angiogénicos MCP-1, IL-8, GCP-2, HGF, KGF, FGF, HB-EGF, TPO o TIMP1. Las células de la invención secretan todos los factores anteriores. Las células de la invención no secretan ninguno de SDF-1alfa, TGF-beta2, ANG2, PDGFbb o VEGF, como se detecta por ELISA.

Las células de la invención se definen según una combinación de las características proporcionadas en la reivindicación 1. Por ejemplo, las células derivadas de tejido del cordón umbilical aisladas requieren L-valina y se derivan de tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre. Las células son capaces de auto-renovación y expansión en cultivo y tienen el potencial de proliferar en células de otros fenotipos; por ejemplo, cardiomiocitos, o sus progenitores. Las células pueden cultivarse bajo un amplio intervalo de condiciones, que incluyen una amplia variedad de medios de cultivo, y condiciones medioambientales. Las células pueden cultivarse al menos de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 39 °C, y posiblemente un intervalo más ancho dependiendo de otras condiciones. Las células pueden cultivarse en medios químicamente definidos, o en medio con suero de mamífero añadido, por ejemplo, suero bovino fetal. Las células también toleran la criopreservación en diversas etapas. Las células pueden mantenerse congeladas, o guardadas en un banco a temperaturas preferentemente a o inferiores a -80 °C durante largos periodos. Otras temperaturas preferidas oscilan de aproximadamente -90 °C a aproximadamente -180 °C o inferiores. Pueden usarse congeladores eléctricos especializados, o las células pueden almacenarse en las fases líquida o vapor del nitrógeno. Los tejidos también pueden guardarse en un banco antes del aislamiento de las células. Preferentemente se siguen los Buenos Procedimientos de Almacenamiento en Bancos, tal como se conoce en la técnica.

Las células de la divulgación son capaces de crecer en atmósferas que contienen oxígeno de aproximadamente el 5 % a al menos aproximadamente el 20 % y comprenden al menos una de las siguientes características: las células tienen el potencial de al menos aproximadamente 40 duplicaciones en cultivo; las células son preferentemente adherentes, así se prefiere la unión y expansión sobre un recipiente de cultivo de tejido recubierto o sin recubrir, en el que un recipiente de cultivo de tejido recubierto comprende un recubrimiento de gelatina, laminina, colágeno, poliornitina, polilisina, vitronectina o fibronectina;

Las células de la divulgación producen preferentemente al menos uno de factor de tejido, vimentina y alfa-actina de músculo liso. Son más preferidas las células de la invención que producen cada uno de factor de tejido, vimentina y alfa-actina de músculo liso; también se prefiere la producción de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, PD-L2 y HLA-A,B,C en las células de la invención. Las células de la divulgación también se caracterizan por la ausencia de producción de al menos uno de CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G y HLA-DR,DP,DQ, como se detecta por citometría de flujo; células más preferibles de la invención carecen de la producción de todos estos marcadores de superficie. También se prefieren células de la divulgación que expresan al menos uno de interleucina 8; reticulón 1; ligando 1 de quimiocinas (motivo C-X-C) (actividad estimulante del crecimiento de melanoma, alfa); ligando 6 de quimiocinas (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica de granulocitos); ligando 3 de quimiocinas (motivo C-X-C); y factor de necrosis tumoral, proteína 3 inducida por alfa. Células preferidas de la divulgación también tienen expresión, que con respecto a una célula humana que es un fibroblasto, un citoblasto mesenquimatoso, o una célula de la médula ósea de las crestas ilíacas, es reducida para al menos uno de: homeocaja 2 de baja estatura; proteína 2 de 27 kDa de choque térmico; ligando 12 de quimiocinas (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células del estroma); elastina (estenosis aórtica supraavalvular, síndrome de Williams-Beuren); ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); homeocaja 2 del mesénquima (homeocaja específica de la detención del crecimiento); homólogo 1 de la homeocaja del seno ocular (*Drosophila*); cristalina, alfa B; activador asociado a dishevelled de la morfogénesis 2; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralina 1; tetranectina (proteína de unión al plasminógeno); dominio de homología tres con src (SH3) y rico en cisteína; gen 1 de translocalización de linfocitos B, antiproliferativo; 25-hidroxilasa del colesterol; factor de transcripción 3 relacionado con runt; proteína hipotética FLJ23191; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de la procolágeno C-endopeptidasa; homólogo 7 de frizzled (*Drosophila*); gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C (hexabraquiona); proteína 5 de la homeocaja de iroquois; hefaestina; integrina, beta 8; glucoproteína 2 de las vesículas sinápticas; ADNc de *Homo sapiens* FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor 1 de tipo receptor de citocinas; canal de potasio activado por calcio de conductancia intermedia/pequeña, subfamilia N, miembro 4; integrina, alfa 7; proteína DKFZP586L151; co-activador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ); homólogo 2 de la homeocaja del seno ocular (*Drosophila*); proteína KIAA1034; respuesta 3 de crecimiento precoz; homeocaja 5 de distal-less; proteína hipotética FLJ20373; familia 1 de la aldo-ceto reductasa, miembro C3 (3-alfa-hidroxiesteroide deshidrogenasa, tipo II); biglicano; fibronectina 1; proencefalina; integrina, 1 similar a beta (con dominios de repetición similares a EGF); inserto de longitud completa de ARNm de *Homo sapiens*; clon de ADNc EUROIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor C del péptido natriurético/guanilato ciclasa C (receptor C del péptido atrionatriurético); proteína hipotética FLJ14054; ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222); proteína 5 de la membrana asociada a vesículas (miobrevina); proteína de la matriz extracelular 1 similar a fibulina que contiene EGF; tipo 3 de proteína de 19 kDa de interacción BCL2/adenovirus E1B; proteína 1 de unión a AE; polipéptido 1 de la subunidad VIIa de la citocromo c oxidasa (músculo); neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; factor de crecimiento similar a la proteína de unión a la insulina 2, 36 kDa; el experto apreciará que la expresión de una amplia variedad de genes se caracteriza convenientemente sobre una matriz génica, por ejemplo, sobre un GENECHIP® de Affymetrix.

Las células secretan una variedad de factores bioquímicamente activos, tales como factores de crecimiento, quimiocinas, citocinas y similares. Estas y otras características están disponibles para identificar y caracterizar las células, y distinguir las células de la invención de otras conocidas en la técnica.

En realizaciones preferidas de la divulgación, la célula comprende dos o más de las características anteriores. Son más preferidas aquellas células que comprenden tres, cuatro, o cinco o más de las características. Son todavía más preferidas aquellas células posparto aisladas que comprenden seis, siete u ocho o más de las características. Todavía son actualmente más preferidas aquellas células que comprenden las nueve características.

También se prefieren actualmente células de la divulgación que producen al menos dos de factor de tejido, vimentina y alfa-actina de músculo liso. Son más preferidas aquellas células que producen las tres proteínas factor de tejido, vimentina y alfa-actina de músculo liso.

El experto apreciará que marcadores celulares son objeto de variar algo bajo condiciones de crecimiento enormemente diferentes, y que generalmente en el presente documento se describen caracterizaciones en medio de crecimiento, o variaciones del mismo. Células derivadas del posparto que producen al menos uno, dos, tres o cuatro de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, PD-L2 y HLA-A,B,C son células preferidas de la divulgación. Son más preferidas aquellas células que producen cinco, seis o siete de estos marcadores de la superficie celular. Las células de la invención producen las ocho de las anteriores proteínas marcadoras de la superficie celular.

Similarmente, las células posparto que carecen de la producción de al menos uno, dos, tres o cuatro de las proteínas

CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G y HLA-DR,DP,DQ, como se detecta por citometría de flujo, son actualmente las células preferidas de la divulgación. También se prefieren células que carecen de la producción de al menos cinco, seis, siete u ocho o más de estos marcadores. Son más preferidas las células que carecen de la producción de al menos nueve o diez de los marcadores de la superficie celular. Las células de la invención carecen de la producción de las once de las anteriores proteínas identificadoras.

Las células de la invención producen cada uno de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, y no producen ninguno de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 o HLA-DR,DP,DQ, como se detecta por citometría de flujo.

Presentemente, se prefiere que las células derivadas del posparto de la divulgación expresen al menos uno, dos o tres de interleucina 8; reticulón 1; ligando 1 de quimiocinas (motivo C-X-C) (actividad estimulante del crecimiento de melanoma, alfa); ligando 6 de quimiocinas (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica de granulocitos); ligando 3 de quimiocinas (motivo C-X-C); y factor de necrosis tumoral, proteína 3 inducida por alfa. Son más preferidas aquellas células que expresan cuatro o cinco de los genes anteriores. La célula de la invención es capaz de expresar seis de los genes anteriores.

Para algunas realizaciones de la divulgación se prefieren células, que con respecto a una célula humana que es un fibroblasto, un citoblasto mesenquimatoso, o una célula de la médula ósea de las crestas ilíacas, tienen expresión reducida para al menos uno de los genes correspondientes a: homeocaja 2 de baja estatura; proteína 2 de 27 kDa de choque térmico; ligando 12 de quimiocinas (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células del estroma); elastina (estenosis aórtica supravalvular, síndrome de Williams-Beuren); ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); homeocaja 2 del mesénquima (homeocaja específica de la detención del crecimiento); homólogo 1 de la homeocaja del seno ocular (*Drosophila*); cristalina, alfa B; activador asociado a dishevelled de la morfogénesis 2; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralina 1; tetranectina (proteína de unión al plasminógeno); dominio de homología tres con src (SH3) y rico en cisteína; gen 1 de translocalización de linfocitos B, antiproliferativo; 25-hidroxisasa del colesterol; factor de transcripción 3 relacionado con runt; proteína hipotética FLJ23191; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de la procolágeno C-endopeptidasa; homólogo 7 de frizzled (*Drosophila*); gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C (hexabraquiona); proteína 5 de la homeocaja de iroquois; hefaestina; integrina, beta 8; glucoproteína 2 de las vesículas sinápticas; ADNc de *Homo sapiens* FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor 1 de tipo receptor de citocinas; canal de potasio activado por calcio de conductancia intermedia/pequeña, subfamilia N, miembro 4; integrina, alfa 7; proteína DKFZP586L151; co-activador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ); homólogo 2 de la homeocaja del seno ocular (*Drosophila*); proteína KIAA1034; respuesta 3 de crecimiento precoz; homeocaja 5 de distal-less; proteína hipotética FLJ20373; familia 1 de la aldo-ceto reductasa, miembro C3 (3-alfa-hidroxiesteroide deshidrogenasa, tipo II); biglicano; fibronectina 1; proencefalina; integrina, 1 similar a beta (con dominios de repetición similares a EGF); inserto de longitud completa de ARNm de *Homo sapiens*; clon de ADNc EUROIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor C del péptido natriurético/guanilato ciclasa C (receptor C del péptido atrionatriurético); proteína hipotética FLJ14054; ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222); proteína 5 de la membrana asociada a vesículas (miobrevina); proteína de la matriz extracelular 1 similar a fibulina que contiene EGF; tipo 3 de proteína de 19 kDa de interacción BCL2/adenovirus E1B; proteína 1 de unión a AE; polipéptido 1 de la subunidad VIIa de la citocromo c oxidasa (músculo); neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; factor de crecimiento similar a la proteína de unión a la insulina 2, 36 kDa. Son más preferidas las células que tienen, con respecto a fibroblastos humanos, citoblastos mesenquimatosos, o células de la médula ósea de las crestas ilíacas, expresión reducida de al menos 5, 10, 15 o 20 genes correspondientes a aquellos enumerados anteriormente. Presentemente son más preferidas células con expresión reducida de al menos 25, 30 o 35 de los genes correspondientes a las secuencias enumeradas. También son más preferidas aquellas células derivadas del posparto que tienen expresión que se reduce, con respecto a la de un fibroblasto humano, un citoblasto mesenquimatoso, o una célula de la médula ósea de las crestas ilíacas, de genes correspondientes a 35 o más, 40 o más de las secuencias enumeradas. Las células más preferidas de la invención son aquellas que tienen expresión que es reducida, con respecto a la de un fibroblasto humano, un citoblasto mesenquimatoso, o una célula de la médula ósea de las crestas ilíacas, de genes correspondientes a todas las secuencias enumeradas.

La secreción de ciertos factores de crecimiento y otras proteínas celulares pueden hacer las células de la invención particularmente útiles. Aunque la secreción de tales factores es útil, las células también pueden caracterizarse por su ausencia de secreción de factores en el medio. En otro aspecto de la invención se proporcionan cultivos celulares terapéuticos, comprendiendo los cultivos celulares las células aisladas como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento de pacientes en necesidad de factores tróficos estimulantes de la angiogénesis. Tales cultivos celulares terapéuticos también se proporcionan para su uso en el tratamiento de un paciente en necesidad de factores tróficos estimulantes del crecimiento neural.

Se proporcionan métodos de derivación de UDC del tejido del cordón umbilical humano. Las células son capaces de auto-renovación y expansión en cultivo, y tienen el potencial de proliferar en células de otros fenotipos. El método comprende (a) obtener tejido del cordón umbilical humano; (b) eliminar sustancialmente toda la sangre para dar un tejido del cordón umbilical sustancialmente libre de sangre, (c) disociar el tejido por tratamiento mecánico o enzimático, o ambos, (d) resuspender el tejido en un medio de cultivo, y (e) proporcionar condiciones de crecimiento

que permiten el crecimiento de una célula derivada de tejido del cordón umbilical humano capaz de auto-renovación y expansión en cultivo y que tiene el potencial de diferenciarse en células de otros fenotipos.

5 El tejido puede obtenerse de cualquier embarazo completado, a término o inferior a término, tanto si es parto vaginalmente, como mediante otras vías, por ejemplo, cesárea quirúrgica. La obtención de tejido de bancos de tejido también se considera dentro del alcance de la presente invención.

10 El tejido se libera sustancialmente de la sangre mediante cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, la sangre puede eliminarse físicamente lavando, aclarando y diluyendo y similares, antes o después de la eliminación de la sangre a granel, por ejemplo, succionando o drenando. Otros medios de obtención de un tejido sustancialmente libre de glóbulos sanguíneos podrían incluir tratamiento enzimático o químico.

15 La disociación de los tejidos umbilicales puede llevarse a cabo por cualquiera de las diversas técnicas conocidas en la técnica, que incluyen por rotura mecánica, por ejemplo, el tejido puede cortarse asépticamente con tijeras, o un bisturí, o tal tejido puede trocearse de otro modo, combinarse, molerse u homogeneizarse de cualquier manera que sea compatible con la recuperación de células intactas o viables de tejido humano.

20 En una realización actualmente preferida, el procedimiento de aislamiento también utiliza un proceso de digestión enzimática. Se conocen en la técnica muchas enzimas por ser útiles para el aislamiento de células individuales de matrices de tejido complejas para facilitar el crecimiento en cultivo. Como se trata anteriormente, está disponible un amplio intervalo de enzimas digestivas para su uso en el aislamiento de células de tejido para el experto. Oscilando de débilmente digestivas (por ejemplo, desoxirribonucleasas y la proteasa neutra, dispasa) a fuertemente digestivas (por ejemplo, papaína y tripsina), tales enzimas están disponibles comercialmente. Una lista no exhaustiva de enzimas compatibles con las mismas incluye actividades de enzimas mucolíticas, metaloproteasas, proteasas neutras, serina proteasas (tales como tripsina, quimotripsina o elastasa) y desoxirribonucleasas. Presentemente se prefieren actividades de enzima seleccionadas de metaloproteasas, proteasas neutras y actividades mucolíticas. Por ejemplo, las colagenasas son conocidas por ser útiles para aislar diversas células de tejidos. Las desoxirribonucleasas pueden digerir ADN monocatenario y pueden minimizar la aglomeración de células durante el aislamiento. Las enzimas pueden usarse solas o en combinación. Las serina proteasas se usan preferentemente en una secuencia siguiendo el uso de otras enzimas, ya que pueden degradar las otras enzimas que se usan. La temperatura y tiempo de contacto con las serina proteasas debe monitorizarse. Las serina proteasas pueden inhibirse con alfa 2 microglobulina en suero y, por tanto, el medio usado para la digestión está preferentemente libre de suero. Comúnmente se usan EDTA y DNasa y pueden mejorar los rendimientos o eficiencias. Métodos preferidos implican el tratamiento enzimático con, por ejemplo, colagenasa y dispasa, o colagenasa, dispasa e hialuronidasa, y se proporcionan métodos tales en los que en ciertas realizaciones preferidas una mezcla de colagenasa y la proteasa neutra dispasa se usan en la etapa de disociación. Son más preferidos aquellos métodos que emplean digestión en presencia de al menos una colagenasa de *Clostridium histolyticum*, y cualquiera de las actividades de proteasa, dispasa y termolisina. Son todavía más preferidos métodos que emplean digestión con tanto actividades de enzima colagenasa como dispasa. También se prefieren métodos que incluyen la digestión con una actividad de hialuronidasa, además de actividades de colagenasa y de dispasa. El experto apreciará que muchos de tales tratamientos con enzimas se conocen en la técnica para aislar células de diversas fuentes de tejido. Por ejemplo, es muy útil la serie LIBERASE Blendzyme (Roche) de combinaciones de enzimas y puede usarse en los presentes métodos. Se conocen otras fuentes de enzimas, y el experto también puede obtener tales enzimas directamente de sus fuentes naturales. El experto también está bien equipado para evaluar enzimas nuevas, o adicionales, o combinaciones de enzimas, para su utilidad en aislar las células de la invención. Tratamientos con enzima preferidos durante 0,5, 1, 1,5 o 2 horas o más. En otras realizaciones preferidas, el tejido se incubaba a 37 °C durante el tratamiento con enzima de la etapa de disociación. Diluir el digesto también puede mejorar el rendimiento de las células, ya que las células pueden estar atrapadas dentro de un digesto viscoso.

50 Aunque se prefiere actualmente el uso de actividades de enzima, no se quiere para métodos de aislamiento como se describe en el presente documento. Los métodos basados en la separación mecánica sola pueden ser satisfactorios en aislar las presentes células del cordón umbilical como se trata anteriormente.

55 Las células pueden resuspenderse después de disociarse el tejido en cualquier medio de cultivo como se trata en el presente documento anteriormente. Las células pueden resuspenderse tras una etapa de centrifugación para separar las células del tejido u otros residuos. La resuspensión puede implicar métodos mecánicos de resuspensión, o simplemente la adición de medio de cultivo a las células.

60 El proporcionar las condiciones de crecimiento permite un amplio intervalo de opciones en cuanto al medio de cultivo, enriquecimientos, condiciones atmosféricas y humedad relativa para las células. Una temperatura preferida es 37 °C, sin embargo, la temperatura puede oscilar de aproximadamente 35 °C a 39 °C dependiendo de las otras condiciones de cultivo y el uso deseado de las células o cultivo.

65 Actualmente se prefieren métodos que proporcionan células que no requieren factores de crecimiento exógenos, excepto como están disponibles en el suero enriquecido proporcionado con el medio de crecimiento. También en el presente documento se proporcionan métodos de derivación de células umbilicales capaces de expansión en

ausencia de factores de crecimiento particulares. Los métodos son similares al método anterior; sin embargo, requieren que los factores de crecimiento particulares (para los que las células no tienen requisito) estén ausentes en el medio de cultivo en el que las células van a resuspenderse y crecerán en él por último lugar. En este sentido, el método es selectivo para aquellas células capaces de división en ausencia de factores de crecimiento particulares.

5 Células preferidas en algunas realizaciones son capaces de crecimiento y expansión en medios de crecimiento químicamente definidos sin suero añadido. En tales casos, las células pueden requerir ciertos factores de crecimiento, que pueden añadirse al medio para soportar y sostener las células. Los factores actualmente preferidos que van a añadirse para el crecimiento sobre medios libre de suero incluyen uno o más de FGF, EGF, IGF y PDGF. En realizaciones más preferidas, dos, tres o los cuatro de los factores se añaden a medios libres de suero o
10 químicamente definidos. En otras realizaciones, LIF se añade al medio sin suero para soportar o mejorar el crecimiento de las células.

También se proporcionan métodos en los que las células pueden expandirse en presencia de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 20 % de oxígeno en su atmósfera. Métodos para obtener células que requieren L-valina requieren que esas células se cultiven en presencia de L-valina. Después de obtenerse una célula, su necesidad de L-valina puede probarse y confirmarse cultivando sobre medio que contiene D-valina que carece del isómero L.

Se proporcionan métodos en los que las células pueden someterse a al menos 25, 30, 35 o 40 duplicaciones antes de alcanzar un estado senescente. Se proporcionan métodos para derivar células capaces de duplicación para alcanzar 10^{14} células o más. Se prefieren aquellos métodos que derivan células que pueden duplicarse suficientemente para producir al menos aproximadamente 10^{14} , 10^{15} , 10^{16} o 10^{17} o más células cuando se siembran a de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^6 células/cm² en cultivo. Preferentemente, estos números de células se producen dentro de 80, 70 o 60 días o menos.

25 En el presente documento también se proporcionan células derivadas de tejido del cordón umbilical humano aisladas derivadas por el método anterior y que tienen las características de la reivindicación 1. Las células mantienen un cariotipo normal coherente a pesar de someterse a pases repetidos en ciertas realizaciones. También se proporcionan cultivos de células derivadas de tejido del cordón umbilical humano derivadas por el método anterior, en los que los cultivos están libres de células maternas. Se proporcionan cultivos terapéuticos que se obtienen por
30 los métodos de la invención.

Hay muchos usos para las células de la presente invención. Por ejemplo, debido a los factores tróficos secretados por las células, pueden ser útiles para el crecimiento, mantenimiento, soporte o similares, de otras células útiles, tanto directamente como indirectamente. Por ejemplo, las células pueden usarse para preparar medios acondicionados, o pueden cultivarse con otras células de interés, que incluyen el co-cultivo *ex vivo* directo o indirecto de células previstas que van a usarse terapéuticamente en un receptor autólogo. Para el co-cultivo directo las células pueden mezclarse juntas, mientras que para el co-cultivo indirecto las células pueden cultivarse en compartimentos separados por membranas semi-permeables que excluyen la migración celular. Por ejemplo, membranas de policarbonato, poliéster (PET) y politetrafluoroetileno recubierto con colágeno (PTFE) de aproximadamente menos de 3 micrómetros de tamaño de poro nominal excluyen la migración celular y son útiles para tales fines. Tales membranas para los sistemas de cultivo son capaces de intercambiar, por ejemplo, factores de crecimiento solubles entre las células derivadas de tejido del cordón umbilical y otro tipo de célula. Ejemplos se conocen en la técnica y algunos están disponibles comercialmente (por ejemplo, membranas de cultivo TRANSWELL (Corning Inc, Corning NY)).

45 En el presente documento también se proporcionan composiciones terapéuticas que comprenden una célula derivada de tejido del cordón umbilical de la invención y otro agente terapéutico o factor. Tales factores incluyen, pero no se limitan a, IGF, LIF, PDGF, EGF, FGF, además de agentes antitrombogénicos y antiapoptóticos. Tales composiciones terapéuticas pueden comprender además uno o más tipos adicionales de células.

50 Además de lo anterior, en el presente documento se describen composiciones derivadas de las propias células. Lisados celulares, fracciones celulares solubles y fracciones celulares enriquecidas en membrana se desvelan todos en el presente documento. Los lisados celulares incluyen lisados en los que sustancialmente todas, y más preferentemente todas las células, se han lisado, por ejemplo, por cizallamiento mecánico, tratamiento enzimático, detergente u otro tratamiento químico, y similares, o combinaciones de los mismos. Los lisados resultantes incluyen todos los componentes de la célula y tienen muchas utilidades, por ejemplo, en soportar o mantener el crecimiento de las células de la invención u otras células de interés. Además, los lisados celulares pueden servir de material de partida para la purificación o enriquecimiento de productos celulares deseables. En realizaciones preferidas, los lisados celulares se separan adicionalmente en al menos una fracción celular soluble y una fracción celular enriquecida en membrana. Cada una puede ser útil para fines específicos. Por ejemplo, si se contemplan usos *in vivo*, por ejemplo, administración mediante inyección, las fracciones celulares solubles pueden ser particularmente útiles en minimizar la estimulación de CMSP alógenas. Más particularmente, las fracciones celulares solubles carecen preferentemente de los antígenos requeridos para estimular reacciones inmunológicas adversas, por ejemplo, la estimulación de linfocitos alógenos, linfocitos T CD4⁺ alógenos, o incluso linfocitos T CD4⁺ sin tratamiento previo. También son útiles y se desvelan en el presente documento matrices extracelulares derivadas de las células, por ejemplo, que comprenden membranas basales. Tal material extracelular es útil para ensayos *in vitro*, por
65

ejemplo, ensayos de angiogénesis. También puede ser útil *in vivo* como parte de una pauta terapéutica. Por ejemplo, se conocen compuestos de la matriz extracelular para su uso en el aumento y reparación tales como aplicaciones referentes a la curación de heridas agudas y crónicas, o en cirugía cosmética y reconstructiva. El material de la matriz extracelular es frecuentemente útil si son deseables propiedades similares al colágeno. El material de la matriz extracelular es particularmente útil en la aplicación que requiere elasticidad o viscosidad debido a que la matriz extracelular parece ser capaz de proporcionar estos atributos. Otra aplicación de matriz extracelular es en combinación con un dispositivo terapéutico implantable. Técnicas para la rotura celular oscilan de suaves a agresivas, el experto está bien equipado para seleccionar la técnica para la rotura de células basada en el uso final del lisado celular así obtenido.

Las composiciones de la divulgación también incluyen medios acondicionados de cultivo como se proporciona en el presente documento. Tales medios se han usado por primera vez para cultivar las células o cultivos de la invención, que durante el crecimiento secretan uno o más productos útiles en el medio. El medio acondicionado de estas células novedosas es útil para muchos fines, que incluyen, por ejemplo, soportar el crecimiento de otras células de mamífero en necesidad de factores de crecimiento o factores tróficos secretados en los medios por las células y cultivos de la invención, y promover, por ejemplo, la angiogénesis. Los medios acondicionados son útiles por los factores de crecimiento secretados que contienen, y preferentemente los medios acondicionados de la presente divulgación contienen uno o más factores de crecimiento útiles para soportar el crecimiento de otra célula de mamífero en necesidad de tales factores de crecimiento. El uso de medios acondicionados es muy entendido por aquellos expertos en la materia. Sistemas de cultivo continuo para generar medio de cultivo acondicionado se contemplan en el presente documento, y las células de la invención son útiles para la producción a gran escala o continua de productos celulares secretados tales como factores de crecimiento.

Preferentemente, los medios acondicionados de la divulgación comprenden uno o más de MCP-1, IL-6, IL-8, GCP-2, HGF, KGF, FGF, HB-EGF, BDNF, TPO o TIMP1. Son más preferidos aquellos medios acondicionados que comprenden varios (por ejemplo, al menos dos, tres o cuatro) de los anteriores. Son todavía más preferidos aquellos que contienen muchos (por ejemplo, al menos cinco, seis, siete, ocho o más) de los factores de crecimiento enumerados. También se prefieren medios acondicionados que comprenden moléculas secretadas adicionales de interés.

Otra realización de la divulgación proporciona un cultivo celular de mamífero que comprende el medio acondicionado y una célula de mamífero en necesidad de MCP-1, IL-6, IL-8, GCP-2, HGF, KGF, FGF, HB-EGF, BDNF, TPO o TIMP1. El cultivar en medios acondicionados proporciona métodos indirectos de soporte, por ejemplo, el crecimiento o mantenimiento de otras células. Por ejemplo, tales métodos indirectos proporcionan formas de expandir poblaciones de células de mamífero, que debido a sus requisitos de factor de crecimiento, son difíciles de expandir en cultivo en ausencia del medio acondicionado.

Otro aspecto de la invención proporciona co-cultivos que comprenden las células derivadas de tejido del cordón umbilical de la invención y otra célula de mamífero de cualquier fenotipo. Estos co-cultivos pueden comprender células de cualquier fenotipo y pueden, por ejemplo, proporcionar una forma de expandir poblaciones de células de mamífero, que debido a sus requisitos de factores de crecimiento, son difíciles de expandir. Esto es una forma de uso de las propiedades de las células derivadas de tejido del cordón umbilical directamente para soportar el crecimiento de otras células. Tales co-cultivos también son de uso *in vivo* para diversas aplicaciones, particularmente si el uso de tales células no genera una respuesta inmunológica no deseada. La presencia de las células derivadas de tejido del cordón umbilical puede estimular el establecimiento y crecimiento de células, por ejemplo, en andamiajes implantados, o en sitios de reparación quirúrgica. En realizaciones preferidas, los co-cultivos comprenden una línea celular humana, además de la célula derivada de tejido del cordón umbilical. Todavía más preferido sería usar las células en un miembro de la familia o persona estrechamente relacionada con el donante. Serían todavía más preferidos los co-cultivos para su uso en el individuo del que se derivaron las células.

En otros aspectos de la invención se proporcionan los usos de los cultivos. Por ejemplo, los cultivos de células derivadas de tejido del cordón umbilical son útiles en promover la angiogénesis. También son útiles en el tratamiento de enfermedad o lesión de tejido blando. En realizaciones preferidas, los cultivos celulares terapéuticos se cultivan sobre un andamiaje o matriz. El crecimiento sobre el andamiaje o matriz o sustrato similar puede ser *in vivo*, *in vitro*, o una combinación de estos. Para aplicación *in vivo*, el sustrato puede aplicarse quirúrgicamente, por ejemplo, como una reparación de tejido blando dañado. El sustrato puede sembrarse con UDC antes del uso quirúrgico. Para aplicaciones *in vitro*, las células pueden ayudar a otras células a establecerse sobre o dentro del sustrato o sus intersticios. Por ejemplo, pueden cultivarse piel u otro tejido blando de capas dérmicas o subdérmicas *in vitro* sobre tales sustratos para el uso posterior. Para usos de combinación, una población de células puede establecerse *in vitro* sobre el sustrato o andamiaje y entonces unirse quirúrgicamente, injertarse o implantarse para el crecimiento adicional. El pre-establecimiento de una población de células, particularmente una que secreta factores angiogénicos, puede conducir a una curación mucho más rápida. Actualmente se prefieren para tales andamiajes matrices poliméricas bioabsorbibles no permanentes y similares.

Se conocen una variedad de andamiajes o matrices en las técnicas de, por ejemplo, ingeniería y cicatrización de tejidos, y son útiles con las células y métodos en el presente documento. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a,

5 esteras, espumas o péptidos de auto-ensamblaje. Esteras preferidas comprenden fibras no tejidas. Pueden formarse esteras no tejidas, por ejemplo, usando fibras comprendidas de un copolímero absorbible sintético de ácidos glicólico y láctico (PGA/PLA), comercializado bajo el nombre comercial VICRYL (Ethicon, Inc., Somerville, NJ). Las espumas preferidas para su uso en el presente documento incluyen espumas porosas tales como aquellas que comprenden, por ejemplo, copolímero de poli(épsilon-caprolactona)/poli(ácido glicólico) (PCL/PGA), como se trata en la patente de EE.UU. N° 6.355.699. Los péptidos de auto-ensamblaje e hidrogeles formados a partir de ellos se conocen en la técnica, e incluyen hidrogel RAD 16, ejemplificado en el presente documento. Tales materiales se usan frecuentemente como soportes para el crecimiento de células o tejido.

10 En el presente documento también se proporcionan usos adicionales para los cultivos celulares terapéuticos de la invención que incluyen, pero no se limitan a, cultivos celulares terapéuticos para su uso en el tratamiento de enfermedad o lesión ósea, el tratamiento de enfermedad o lesión pancreática, el tratamiento de enfermedad o lesión renal, el tratamiento de enfermedad o lesión neural, enfermedad o lesión cardíaca y el tratamiento de enfermedad o lesión hepática.

15 En otro de sus aspectos, la invención proporciona estructuras de mayor orden, tales como estructuras de tejido implantable que comprenden las células de la invención, de tejido humano implantable matriz que comprende las células, tejidos humanos que comprenden las células, y órganos humanos que comprenden estas células.

20 La divulgación también describe, en otro de sus varios aspectos, células terapéuticas inyectables que comprenden células derivadas del cordón umbilical humano aisladas capaces de auto-renovación y expansión en cultivo y que tienen el potencial de diferenciarse en células de otros fenotipos, en las que las células no estimulan sustancialmente linfocitos alógenos en una reacción de linfocitos mixtos, y producen PD-L2, pero no HLA-G, CD178, HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86 o B7-H2. Esta composición de células terapéuticas inyectables es útil como tratamiento terapéutico en cualquier aplicación en la que células sin diferenciar puede ser reclutadas a un sitio mediante la circulación. En realizaciones preferidas, la célula inyectable se trata para inactivar factor de tejido. Tal tratamiento incluye cualquier tratamiento capaz de inactivar factor de tejido sin destruir la integridad de la célula. Son más preferidos tratamientos que no tienen efecto sobre la viabilidad, tiempo de duplicación o expansión. La célula inyectable se trata con un anticuerpo anti-factor de tejido en una realización actualmente preferida.

30 Conjuntamente con células terapéuticas, otras moléculas biológicamente activas, tales como agentes antitrombogénicos, agentes antiapoptóticos y agentes antiinflamatorios, pueden ser útiles y pueden administrarse en secuencia con, o co-administrarse con las células, individualmente o en combinaciones o dos o más de tales compuestos o agentes. Por ejemplo, los agentes antiapoptóticos pueden ser útiles para minimizar la muerte celular programada. Tales agentes incluyen, pero no se limitan a, EPO, derivados y análogos de EPO, y sus sales, TPO, IGF-I, IGF-II, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) e inhibidores de la caspasa. Los agentes antiinflamatorios incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de MAP cinasas P38, estatinas, inhibidores de IL-6 e IL-1, Pemirolast, Tranilast, Remicade, Sirolimus, compuestos antiinflamatorios no esteroideos, por ejemplo, Tepoxalin, Tolmetin y Suprofen.

40 Otros factores bioactivos o agentes terapéuticos que pueden co-administrarse con las células terapéuticas de la invención incluyen, por ejemplo, factores antitrombogénicos, agentes inmunosupresores o inmunomoduladores, y antioxidantes. Ejemplos de agentes inmunosupresores e inmunomoduladores incluyen inhibidores de calcineurina, por ejemplo, ciclosporina, Tacrolimus, inhibidores de mTOR tales como Sirolimus o Everolimus; antiproliferativos tales como azatioprina y micofenolato mofetilo; corticosteroides, por ejemplo, prednisolona o hidrocortisona; anticuerpos tales como anticuerpos monoclonales anti-receptor de IL-2Ra, Basiliximab, Daclizumab; anticuerpos policlonales anti-linfocitos T tales como globulina anti-timocitos (ATG); globulina anti-linfocitos (ALG), y el anticuerpo monoclonal anti-linfocitos T OKT3. Los compuestos antitrombogénicos que pueden ser terapéuticamente proporcionados conjuntamente con las células de la invención incluyen, por ejemplo, heparina, derivados de heparina, urocinasa y PPACK (dextrofenilalanina prolina arginina clorometilcetona); compuestos anti-trombina, antagonistas de receptores plaquetarios, anticuerpos anti-trombina, anticuerpos anti-receptores plaquetarios, aspirina, dipiridamol, protamina, hirudina, inhibidores de prostaglandina e inhibidores de plaquetas. Los antioxidantes son muy conocidos en la técnica, por supuesto, y cualquier antioxidante farmacéuticamente aceptable puede administrarse conjuntamente con las células de la invención que incluyen probucol; vitaminas A, C y E, coenzima Q-10, glutatión, L-cisteína, N-acetilcisteína, o derivado de antioxidante, análogos o sales de los anteriores.

55 En otro aspecto de la invención se proporcionan kits para el crecimiento y mantenimiento, el aislamiento y el uso de las células derivadas de tejido del cordón umbilical. Las células pueden emplearse convenientemente como partes de kits, por ejemplo, para un kit para cultivo o implantación. La invención proporciona un kit que incluye las UDC y componentes adicionales, que incluyen instrucciones para el crecimiento o mantenimiento, aislamiento o uso de las células, junto con, por ejemplo, material de matriz (por ejemplo, un andamiaje), agentes hidratantes (por ejemplo, soluciones salinas fisiológicamente compatibles, medios de cultivo celular preparados), sustratos de cultivo celular (por ejemplo, placas de cultivo, placas, viales, etc.), medios de cultivo celular (tanto en forma líquida como deshidratada), compuestos antibióticos, hormonas y similares. Los kits de la divulgación para el crecimiento pueden, por ejemplo, incluir todos los componentes del medio de crecimiento como se usa en el presente documento, que incluyen suero, por ejemplo, suero bovino fetal. Aunque el kit puede incluir cualquiera de tales componentes,

preferentemente incluye todos los componentes necesarios para su uso previsto. Un kit para el crecimiento de la invención también incluye células de la invención (normalmente criopreservadas), que, si se desea, pueden sembrarse en la red cristalina como se describe en el presente documento. Los kits de la divulgación para el aislamiento contendrán todo lo requerido para poner en práctica los métodos de aislamiento como se proporcionan en el presente documento, excepto por el tejido del cordón umbilical, que debe obtenerse fresco o congelado de un banco de tejido en el momento del aislamiento. Se proporcionan el equipo quirúrgico para disociar el tejido, enzimas preferidas o elecciones de enzimas en forma estable, ya que son los tampones y medio, filtros de células y similares, según se requiera o se prefiera para el método que se ha desvelado anteriormente. Se proporcionan convenientemente instrucciones detalladas con etapas opcionales y listas de proveedores de materiales opcionales o alternativos. Pueden incluirse células de control en un kit de la invención para la comparación de las células aisladas con, por ejemplo, los cultivos de UDC depositados en la ATCC. Los kits para utilizar las células derivadas de tejido del cordón umbilical contienen preferentemente poblaciones de las células, o composiciones terapéuticas que comprenden las células. En algunas realizaciones, los kits pueden incluir una o más poblaciones de células, que incluyen al menos UDC y un vehículo farmacéuticamente aceptable (líquido, semi-sólido o sólido). Las poblaciones en algunas realizaciones son homogéneas o incluso líneas celulares clonales de UDC. En otras realizaciones, los kits incluyen otras líneas celulares para su uso en co-cultivo. Los kits de aplicación terapéutica incluyen preferentemente agentes bioactivos adicionales según se desee, por ejemplo, agentes antitrombogénicos, agentes antiinflamatorios, agentes antiapoptóticos y compuestos inmunosupresores o inmunomoduladores. Los kits también pueden incluir opcionalmente un medio de administración de células, por ejemplo, mediante inyección. Los kits pueden incluir adicionalmente instrucciones para su uso de las células. Los kits preparados para uso en hospitales de campaña, tales como para uso militar, pueden incluir suministros de procedimiento completo que incluyen andamiajes de tejido, suturas quirúrgicas y similares, en los que las células van a usarse conjuntamente con la reparación de lesiones agudas. Los kits para ensayos y métodos *in vitro* como se describen en el presente documento pueden contener uno o más de (1) UDC o fracciones, componentes o productos de UDC, (2) reactivos para poner en práctica el método *in vitro*, (3) otras células o poblaciones de células, según convenga, por ejemplo, para co-cultivos y (4) instrucciones para realizar el método *in vitro*.

Los siguientes ejemplos describen varios aspectos de realizaciones de la invención en mayor detalle. Estos ejemplos pretenden ilustrar adicionalmente aspectos de la invención descritos en el presente documento. Estos ejemplos no deben interpretarse para limitar el aspecto así ejemplificado.

Ejemplo 1

Aislamiento de células de tejido del cordón umbilical posparto

Se obtuvieron tejidos del cordón umbilical posparto tras el parto de tanto embarazo a término como prematuro. Las células se recogieron de cinco donantes separados de tejido del cordón umbilical. Se probaron diferentes métodos de aislamiento de las células para su capacidad para dar células con: 1) el potencial de diferenciarse en células con diferentes fenotipos, una característica común a los citoblastos, o 2) el potencial para proporcionar factores tróficos críticos útiles para otras células y tejidos.

Métodos y materiales

Aislamiento de células umbilicales. Se obtuvieron cordones umbilicales del National Disease Research Interchange (NDRI, Philadelphia, PA). Los tejidos se obtuvieron tras partos normales. Los protocolos de aislamiento de células se realizaron asépticamente en una campana de flujo laminar. Para eliminar sangre y residuos, el cordón se lavó en solución salina tamponada con fosfato (PBS; Invitrogen, Carlsbad, CA) en presencia de penicilina a 100 unidades/mililitro y estreptomycin a 100 microgramos/mililitro y anfotericina B a 0,25 microgramos/mililitro (Invitrogen Carlsbad, CA). Entonces, los tejidos se disociaron mecánicamente en placas de cultivo de tejido de 150 cm² en presencia de 50 mililitros de medio (DMEM-bajo en glucosa o DMEM-alto en glucosa; Invitrogen) hasta que el tejido se trituró en una fina pulpa. Los tejidos cortados se transfirieron a tubos cónicos de 50 mililitros (aproximadamente 5 gramos de tejido por tubo).

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

Después de la digestión, los tejidos se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos, el sobrenadante se aspiró. El sedimento se resuspendió en 20 mililitros de medio de crecimiento (DMEM-bajo en glucosa (Invitrogen), 15 por ciento (v/v) de suero bovino fetal (FBS; suero bovino definido; Lote n° AND18475; Hyclone, Logan, UT), 0,001 %

(v/v) de 2-mercaptoetanol (Sigma), penicilina a 100 unidades por mililitro, estreptomycin a 100 microgramos por mililitro y anfotericina B a 0,25 microgramos por mililitro (cada uno de Invitrogen, Carlsbad, CA). La suspensión de células se filtró a través de un filtro de células BD FALCON de nailon de 70 micrómetros (BD Biosciences, San Jose, CA). Se pasó un aclarado de 5 mililitros adicional que comprendía medio de crecimiento a través del tamiz. Entonces, la suspensión de células se pasó a través de un filtro de células de nailon de 40 micrómetros (BD Biosciences, San Jose, CA) y se cazó con un aclarado de 5 mililitros adicionales de medio de crecimiento.

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

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

Las células aisladas de tejidos del cordón umbilical se sembraron a 5.000 células/cm² sobre matraces T-75 cm² recubiertos de gelatina (Corning Inc., Corning, NY) en medio de crecimiento. Después de dos días, el medio agotado y las células sin adherir se aspiraron de los matraces. Las células adherentes se lavaron con PBS tres veces para eliminar residuos y células derivadas de la sangre. Entonces, las células se repusieron con medio de crecimiento y se dejó que crecieran a confluencia (aproximadamente 10 días desde el pase 0) hasta el pase 1. En pases posteriores (del pase 1 a 2, etc.), las células alcanzaron la sub-confluencia (75-85 por ciento de confluencia) en 4-5 días. Para estos pases posteriores, las células se sembraron a 5.000 células/cm². Las células se cultivaron en una estufa de incubación humidificada con 5 por ciento de dióxido de carbono a 37 °C.

Aislamiento de células usando LIBERASE Blendzymes. Se aislaron células de tejidos posparto en medio de DMEM-bajo en glucosa con LIBERASE (2,5 miligramos por mililitro, Blendzyme 3; Roche Applied Sciences, Indianápolis, IN) e hialuronidasa (5 unidades/mililitro, Sigma). La digestión del tejido y el aislamiento de las células fue como se ha descrito para otras digestiones con proteasa anteriores, sin embargo, se usó una mezcla de LIBERASE/hialuronidasa en lugar de la mezcla de enzimas C:D o C:D:H. La digestión de tejido con LIBERASE produjo el aislamiento de las poblaciones de células de tejidos posparto que se expandieron fácilmente.

Aislamiento de células usando otras combinaciones de enzimas. Se compararon los procedimientos para aislar células del cordón umbilical usando diferentes combinaciones de enzimas. Las enzimas comparadas para la digestión incluyeron: i) colagenasa; ii) dispasa; iii) hialuronidasa; iv) mezcla de colagenasa:dispasa (C:D); v) mezcla de colagenasa:hialuronidasa (C:H); vi) mezcla de dispasa:hialuronidasa (D:H); y vii) mezcla de colagenasa:dispasa:hialuronidasa (C:D:H). Se observaron diferencias en el aislamiento de las células utilizando estas diferentes condiciones de digestión con enzimas (Tabla 1-1).

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

Aislamiento de células de sangre del cordón. También se han aislado células de muestras de sangre del cordón obtenidas de NDRI. El protocolo de aislamiento usado fue el de la solicitud de patente internacional US0229971 por Ho et al. Se mezclaron muestras (50 mililitros y 10,5 mililitros, respectivamente) de sangre del cordón umbilical (NDRI, Philadelphia PA) con tampón de lisis (cloruro de amonio 155 milimolar esterilizado por filtración, bicarbonato potásico 10 milimolar, EDTA 0,1 milimolar tamponado a pH 7,2 (todos los componentes de Sigma, St. Louis, MO)). Las células se lisaron a una relación de 1:20 de sangre del cordón con respecto a tampón de lisis. La suspensión de células resultante se agitó con vórtex durante 5 segundos, y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente. El lisado se centrifugó (10 minutos a 200 x g). El sedimento de células se resuspendió en medio esencial mínimo completo (Gibco, Carlsbad CA) que contenía 10 por ciento de suero bovino fetal (Hyclone, Logan UT), glutamina 4 milimolar (Mediatech Herndon, VA), penicilina a 100 unidades por mililitro y estreptomycin a 100 microgramos por mililitro (Gibco, Carlsbad, CA). Las células resuspendidas se centrifugaron (10 minutos a 200 x g), el sobrenadante se aspiró y el sedimento de células se lavó en medio completo. Las células se sembraron directamente en tanto matraces T75 (Corning, NY), matraces T75 recubiertos de laminina, como matraces T175 recubiertos de fibronectina (ambos de Becton Dickinson, Bedford, MA).

Aislamiento de células usando combinaciones de enzimas y condiciones de crecimiento diferentes. Para determinar si las poblaciones de células podrían aislarse bajo diferentes condiciones y expandirse bajo una variedad de condiciones inmediatamente después del aislamiento, las células se digirieron en medio de crecimiento con o sin 0,001 por ciento (v/v) de 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), usando la combinación de enzimas C:D:H, según los procedimientos proporcionados anteriormente. Todas las células se cultivaron en presencia de penicilina a 100 unidades por mililitro y estreptomycin a 100 microgramos por mililitro. Bajo todas las condiciones probadas, las

células se unieron y se expandieron bien entre el pase 0 y 1 (Tabla 1-2). Se demostró que las células en las condiciones 5-8 y 13-16 proliferaron bien hasta 4 pases después de sembrarse, momento en el que se criopreservaron.

5 **Resultados**

Aislamiento de células usando combinaciones de enzimas diferentes. La combinación de C:D:H proporcionó el mejor rendimiento de células tras el aislamiento y generó células que se expandieron durante muchas más generaciones en cultivo que las otras condiciones (Tabla 1-1). No se obtuvo una población de células expandible usando colagenasa o hialuronidasa solas. No se hizo intento por determinar si este resultado era específico para la colagenasa que se probó.

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

Digestión con enzimas	Celulas aisladas	Expansión células
Colagenasa	X	X
Dispasa	+ (> 10 h)	+
Hialuronidasa	X	X
Colagenasa:Dispasa	++ (< 3 h)	++
Colagenasa:Hialuronidasa	++ (< 3 h)	+
Dispasa:Hialuronidasa	+ (> 10 h)	+
Colagenasa:Dispasa:Hialuronidasa	+++ (< 3 h)	+++
Clave: + = buena, ++ = muy buena, +++ = excelente, X = no existosa		

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

35 **Tabla 1-2:** Aislamiento y expansión del cultivo de células posparto bajo condiciones variables:

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

5 **Aislamiento de células de sangre residual en los cordones.** Las células nucleadas se unieron y crecieron rápidamente. Estas células se analizaron por citometría de flujo y fueron similares a las células obtenidas por digestión con enzimas.

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

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

20 También se aislaron células de sangre residual en los cordones, pero no sangre del cordón. La presencia de células en coágulos de sangre lavados del tejido, que se adhieren y crecen en las condiciones usadas, puede ser debida a células que se liberan durante el proceso de disección.

25 Referencia

1. Ho, Tony, W., et al., WO2003025149 A2 "CELL POPULATIONS WHICH CO-EXPRESS CD49C AND CD90" NEURONYX, INC. Solicitud N° US0229971 US, presentada 20020920, A2 publicada 20030327, A3 publicada 20031218.

30 **EJEMPLO 2**

Características de crecimiento de células derivadas del cordón umbilical

35 Se comparó el potencial de expansión de células de células derivadas del cordón umbilical con otras poblaciones de citoblastos aislados. El proceso de expansión de células hasta la senescencia se denomina límite de Hayflick (Hayflick L. The longevity of cultured human cells. J. Am. Geriatr. Soc. 22(1):1-12, 1974; Hayflick L. The strategy of senescence. Gerontologist 14(1):37-45), 1974).

40 **Material y métodos**

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

45 **Comparación del potencial de expansión de células derivadas del cordón umbilical con otras poblaciones de células.** Para la comparación del potencial de expansión por crecimiento, se utilizaron las siguientes poblaciones de células: i) Citoblastos mesenquimatosos (MSC; Cambrex, Walkersville, MD); ii) Células derivadas de adiposas (patente de EE.UU. N° 6.555.374 B1; solicitud de patente de EE.UU. US20040058412); iii) Fibroblastos de piel dérmica normal (cc-2509 lote n° 9F0844; Cambrex, Walkersville, MD); y iv) Células derivadas del cordón umbilical. Las células se sembraron inicialmente a 5.000 células/cm² sobre matraces T75 recubiertos de gelatina en medio de crecimiento. Para los pases posteriores, los cultivos celulares se trataron del siguiente modo. Después de la tripsinación, las células viables se contaron después de la tinción con azul de tripano. La suspensión de células (50 microlitros) se combinó con azul de tripano (50 microlitros, Sigma, St. Louis MO). Se estimaron los números de células viables usando un hemocitómetro.

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

60 En cada pase, las células se tripsinaron y se contaron. Se calcularon el rendimiento de células viables, duplicaciones de la población [$\ln(\text{células finales}/\text{células iniciales})/\ln 2$] y el tiempo de duplicación (tiempo en cultivo / duplicación de la población). Para los fines de determinar la expansión óptima de células, se determinó el rendimiento de células total por pase multiplicando el rendimiento total para el pase previo por el factor de expansión para cada pase (es

decir, factor de expansión = células finales / células iniciales).

Potencial de expansión de los bancos de células a baja densidad. También se probó el potencial de expansión de las células almacenadas en el banco en el pase 10. Se usó un conjunto diferente de condiciones. Se probaron fibroblastos de piel dérmica normal (cc-2509 lote nº 9F0844; Cambrex, Walkersville, MD), células derivadas del cordón umbilical y células derivadas de la placenta. Estas poblaciones de células se habían almacenado en el banco en el pase 10 previamente, que se habían cultivado a 5.000 células/cm² en cada pase hasta ese momento. Se determinó el efecto de la densidad celular sobre las poblaciones de células tras la descongelación de las células en el pase 10. Las células se descongelaron bajo condiciones estándar, se contaron usando tinción con azul de tripano. Entonces, las células descongeladas se sembraron a 1.000 células/cm² en medio de crecimiento. Las células se cultivaron bajo condiciones atmosféricas estándar a 37 °C. El medio de crecimiento se cambió dos veces a la semana. Las células se sometieron a pases ya que alcanzaron aproximadamente el 85 % de confluencia. Las células se sometieron posteriormente a pases hasta la senescencia, es decir, hasta que ya no pudieron expandirse más. Las células se tripsinaron y se contaron en cada pase. El rendimiento de las células, duplicación de la población ($\ln(\text{células finales/células iniciales})/\ln 2$) y tiempo de duplicación (tiempo en cultivo / duplicación de la población). El rendimiento de células total por pase se determinó multiplicando el rendimiento total para el pase previo por el factor de expansión para cada pase (es decir, factor de expansión = células finales / células iniciales).

Expansión de células derivadas del cordón umbilical a baja densidad a partir de la siembra de células inicial.

Se probó en otro experimento el potencial de expansión de cultivos de células derivadas del cordón umbilical recién aisladas bajo condiciones de baja siembra de células. Se aislaron células derivadas del cordón umbilical como se describe en un ejemplo previo. Las células se sembraron a 1.000 células/cm² y se sometieron a pases como se ha descrito anteriormente hasta la senescencia. Las células se cultivaron bajo condiciones atmosféricas estándar a 37 °C. El medio de crecimiento se cambió dos veces por semana. Las células se sometieron a pases cuando alcanzaron aproximadamente el 85 % de confluencia. En cada pase, las células se tripsinaron y se contaron por tinción con azul de tripano. Se calcularon el rendimiento de células, duplicación de la población ($\ln(\text{célula final/célula inicial})/\ln 2$) y el tiempo de duplicación (tiempo en cultivo / duplicación de la población) para cada pase. El rendimiento de células total por pase se determinó multiplicando el rendimiento total para el pase previo por el factor de expansión para cada pase (es decir, factor de expansión = célula final/célula inicial). Las células se cultivaron sobre matraces recubiertos de gelatina y sin gelatina.

Expansión de células en condiciones de cultivo de oxígeno bajo. Se ha demostrado que las condiciones de cultivo celular de O₂ bajo pueden mejorar la expansión de células en ciertas circunstancias (Csete, Marie; Doyle, John; Wold, Barbara J.; McKay, Ron; Studer, Lorenz. Low oxygen culturing of central nervous system progenitor cells. Documento US20040005704). Con el fin de determinar si la expansión de células de células derivadas del cordón umbilical podría mejorarse alterando las condiciones del cultivo celular, se cultivaron cultivos de células derivadas del cordón umbilical en condiciones de oxígeno bajo. Las células se sembraron a 5.000 células/cm² en medio de crecimiento sobre matraces recubiertos de gelatina. Las células se cultivaron inicialmente bajo condiciones atmosféricas estándar hasta el pase 5, momento en el que se transfirieron a condiciones de cultivo de oxígeno bajo (5 % de O₂).

Otras condiciones de crecimiento. En otros experimentos se expandieron células sobre placas sin recubrir, recubiertas de colágeno, recubiertas de fibronectina, recubiertas de laminina y recubiertas con Matrigel. Se ha demostrado que los cultivos se expanden bien sobre estas matrices diferentes.

Resultados

Comparación del potencial de expansión de células derivadas del cordón umbilical con otras poblaciones de células. Se expandieron células derivadas del cordón umbilical durante más de 40 pases generando rendimientos de células de > 1E17 células en 60 días. A diferencia, las MSC y los fibroblastos senescieron después de < 25 días y < 60 días, respectivamente. Aunque tanto las células derivadas de adiposas como epiloicas se expandieron durante casi 60 días, generaron rendimientos de células totales de 4,5E12 y 4,24E13, respectivamente. Así, cuando se sembraron a 5.000 células/cm² bajo las condiciones experimentales utilizadas, las células derivadas del cordón umbilical se expandieron mucho mejor que los otros tipos de células cultivados bajo las mismas condiciones (Tabla 2-1).

Tabla 2-1: Características de crecimiento para diferentes poblaciones de células cultivadas hasta la senescencia

Tipo de célula	Senectud	Población Total duplicaciones	Rendimiento (células totales)
MSC	24 d	8	4.72 E7
Células derivadas de tejido adiposo	57 d	24	4.5 E12
Fibroblastos	53 d	26	2.82 E13
Umbilical	65 d	42	6.15 E17

Expansión del potencial de bancos de células a baja densidad. Células derivadas del cordón umbilical y de fibroblasto se expandieron durante más de 10 pases generando rendimientos de células de > 1E11 células en 60 días (Tabla 2-2). Bajo estas condiciones, los fibroblastos y las poblaciones de células derivadas del cordón umbilical senescieron después de 80 días, completando > 50 y > 40 duplicaciones de la población, respectivamente.

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

Tipo de célula	Senectud	Población Total duplicaciones	Rendimiento (células totales)
Fibroblastos (P10)	80 días	43.68	2.59 E11
Umbilical (P 10)	80 días	53.6	1.25 E14

Expansión de células en condiciones de cultivo oxígeno bajo. Se expandieron bien células bajo condiciones de oxígeno reducido; sin embargo, el cultivo bajo condiciones de oxígeno bajo no parece tener un efecto significativo sobre la expansión de células para células derivadas del posparto. Estos resultados son preliminares en el sentido de que cualquier conclusión definitiva que se haga referente al efecto de oxígeno reducido se sacaría mejor de experimentos en crecimiento en bajo oxígeno desde el aislamiento inicial. Las condiciones atmosféricas estándar ya han demostrado ser satisfactorias para cultivar números de células suficientes, y no se requiere cultivo a oxígeno bajo para el crecimiento de células derivadas del posparto.

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

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

Referencias

- 1) Hayflick L. The longevity of cultured human cells. J Am Geriatr Soc. 22:1-12, 1974.
- 2) Hayflick L. The strategy of senescence. Gerontologist 14(1):37-45, 1974.
- 3) Solicitud de patente de Estados Unidos N° 20040058412
- 4) Solicitud de patente de Estados Unidos N° 20040048372
- 6) Csete, Marie; Doyle, John; Wold, Barbara J.; McKay, Ron; y Studer, Lorenz. Low oxygen culturing of central nervous system progenitor cells. Solicitud de patente de Estados Unidos N° 20040005704.

EJEMPLO 3

Crecimiento de células derivadas del cordón umbilical en medio que contiene D-Valina

Se ha informado que el medio que contiene D-valina en lugar de la isoforma de L-valina normal puede usarse para inhibir selectivamente el crecimiento de células similares a fibroblastos en cultivo (Hongpaisan, 2000; Sordillo et al., 1988). Se realizaron experimentos para determinar si las células derivadas del cordón umbilical crecerían en medio que contiene D-valina.

Métodos y material

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

Resultados

Ni las células derivadas del cordón umbilical ni las células de fibroblasto sembradas en el medio que contenía D-valina proliferaron, a diferencia de las células sembradas en medio de crecimiento que contenía suero dializado. Las células de fibroblasto cambiaron morfológicamente, aumentando en tamaño y cambiando la forma. Todas las células murieron y con el tiempo se desprendieron de la superficie del matraz después de cuatro semanas. Así, puede llegarse a la conclusión de que las células derivadas del cordón umbilical requieren L-valina para el crecimiento celular y para mantener la viabilidad a largo plazo.

Referencias

Hongpaisan J. (2000) Inhibition of proliferation of contaminating fibroblasts by D-valine in cultures of smooth muscle cells from human myometrium. Cell Biol Int. 24:1-7.

Sordillo LM, Oliver SP, Akers RM. (1988) Culture of bovine mammary epithelial cells in D-valine modified medium: selective removal of contaminating fibroblasts. Cell Biol Int Rep.12:355-64.

EJEMPLO 4

Análisis del cariotipo de PPDC derivadas del cordón umbilical

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

Materiales y métodos

Se cultivaron PPDC de tejido posparto de un neonato masculino en medio de crecimiento. Se seleccionó tejido posparto de un neonato masculino (X,Y) para permitir la distinción entre células derivadas de neonato y células derivadas de la madre (X,X). Las células se sembraron a 5.000 células por centímetro cuadrado en medio de crecimiento en un matraz T25 (Corning, Corning, NY) y se expandieron al 80 % de confluencia. Se llenó un matraz T25 que contenía células hasta el cuello con medio de crecimiento. Las muestras se entregaron a un laboratorio de citogenética por mensajería (el tiempo de transporte estimado de laboratorio a laboratorio es una hora). El análisis de cromosomas se realizó por el Center for Human & Molecular Genetics at the New Jersey Medical School, Newark, NJ. Las células se analizaron durante la metafase cuando los cromosomas se visualizan mejor. De veinte células contadas en la metafase, cinco se analizaron para el número de cariotipos homogéneos normales (dos). Una muestra de células se caracterizó como homogénea si se observaron dos cariotipos. Una muestra de células se caracterizó como heterogénea si se observaron más de dos cariotipos. Se contaron células en metafase adicionales y se analizaron cuando e identificó un número de cariotipos heterogéneos (cuatro).

Resultados

Todas las muestras de células enviadas para el análisis de cromosomas fueron interpretadas como que presentaban un aspecto normal. Cada una de las muestras celulares se caracterizó como homogénea (Tabla 4-1).

Tabla 4-1. Resultados del cariotipo de las PPDC.

Tejido	Paso	Células en metafase contadas	Células en metafase analizadas	Número de cariotipos	ISCN Cariotipo
Umbilical	23	20	5	2	46, XX
Umbilical	6	20	5	2	46, XY
Umbilical	3	20	5	2	46, XX

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

EJEMPLO 5

Evaluación por citometría de flujo de marcadores de la superficie celular derivados del cordón umbilical

humano

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

Materiales y métodos

10 **Medios y recipientes de cultivo.** Las células se cultivaron en medio de crecimiento, en matraces de cultivo de tejido T75, T150 y T225 tratados con plasma (Corning, Corning, NY) hasta que confluyeron. Las superficies de crecimiento de los matraces se recubrieron con gelatina incubando con 2 % (peso/volumen) de gelatina (Sigma, St. Louis, MO) durante 20 minutos a temperatura ambiente.

15 **Tinción con anticuerpo.** Las células adherentes en matraces se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS); (Gibco, Carlsbad, MO) y se desprendieron con tripsina/EDTA (Gibco). Las células se recogieron, se centrifugaron y se resuspendieron en 3 % (v/v) de FBS en PBS a una concentración de células de 1×10^7 por mililitro. Según las especificaciones del fabricante, el anticuerpo para el marcador de la superficie celular de interés (véase más adelante) se añadió a 100 microlitros de suspensión de células y la mezcla se incubó en la oscuridad durante 20 30 minutos a 4 °C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar el anticuerpo sin unir. Las células se resuspendieron en 500 microlitros de PBS y se analizaron por citometría de flujo.

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

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

30 **Tabla 5-1.** Anticuerpos usados en la caracterización de marcadores de la superficie celular de UDC

	Anticuerpo	Fabricación	Número catálogo
	CD10	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555375
35	CD13	BD Pharmingen	555394
	CD31	BD Pharmingen	555446
	CD34	BD Pharmingen	555821
40	CD44	BD Pharmingen	555478
	CD45RA	BD Pharmingen	555489
	CD73	BD Pharmingen	550257
	CD90	BD Pharmingen	555596
45	CD 117	BD Pharmingen	340529
	CD141	BD Pharmingen	559781
	PDGFr-alpha	BD Pharmingen	556002
50	HLA-A, B, C	BD Pharmingen	555553
	HLA-DR, DP, DQ	BD Pharmingen	555558
	IgG-FITC	Sigma (St. Louis, MO)	F-6522
55	IgG- PE	Sigma	P-4685

Comparación pase a pase. Se analizaron células derivadas del cordón umbilical en los pases 8, 15 y 20.

60 **Comparación donante a donante.** Para comparar diferencias entre donantes, se compararon entre sí el cordón umbilical de diferentes donantes.

Comparación del recubrimiento superficial. Se compararon células derivadas del cordón umbilical sobre matraces recubiertos de gelatina con cordón umbilical cultivado sobre matraces sin recubrir.

65 **Resultados**

Caracterización de células derivadas del cordón umbilical. Células derivadas del cordón umbilical analizadas por citometría de flujo mostraron expresión positiva de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, indicado por los elevados valores de fluorescencia con respecto al control de IgG (datos no mostrados). Estas células fueron negativas para la expresión detectable de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ, indicado por valores de fluorescencia comparables al control de IgG (datos no mostrados). Se consideraron variaciones en los valores de fluorescencia de curvas positivas. La media (es decir, CD13) y el intervalo (es decir, CD90) de las curvas positivas mostraron alguna variación, pero las curvas parecieron normales, confirmando una población homogénea. Ambas curvas presentaron individualmente valores superiores al control de IgG.

Comparación pase a pase. Células umbilicales en el pase 8, 15 y 20 analizadas por citometría de flujo expresaron todas CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, indicado por la elevada fluorescencia con respecto al control de IgG. Estas células fueron negativas para CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ, indicado por valores de fluorescencia de acuerdo con el control de IgG. Las variaciones en los valores de detección de la fluorescencia de curvas positivas estuvieron dentro de los intervalos esperados. Aunque las medias (es decir, CD13) de las curvas positivas variaron, todas las curvas presentaron individualmente valores mayores que el control de IgG.

Comparación donante a donante. Células derivadas del cordón umbilical aisladas de donantes separados analizadas por citometría de flujo mostraron expresión positiva de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, reflejado en los elevados valores de fluorescencia con respecto al control de IgG. Estas células fueron negativas para la expresión de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ, con valores de fluorescencia de acuerdo con el control de IgG. Se representaron las variaciones en los valores de detección de la fluorescencia de curvas positivas. Aunque la media (es decir, CD10) de las curvas positivas varió, ambas curvas presentaron individualmente valores mayores que el control de IgG.

El efecto del recubrimiento superficial con gelatina. Células umbilicales expandidas sobre matraces con gelatina y sin recubrir analizadas por citometría de flujo fueron todas positivas para la expresión de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, con elevados valores de fluorescencia con respecto al control de IgG. Estas células fueron negativas para la expresión de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ, con valores de fluorescencia de acuerdo con el control de IgG.

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

EJEMPLO 6

Análisis de células por matrices de oligonucleótidos

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

Materiales y métodos

Aislamiento y cultivo de células

Células derivadas de tejido posparto. Se obtuvieron cordones umbilicales y placenta humanos del National Disease Research Interchange (NDRI, Philadelphia, PA) de partos a término completos normales con el consentimiento de la paciente. Se recibieron los tejidos y las células se aislaron como se describe en el Ejemplo 1. Las células se cultivaron en medio de crecimiento sobre matraces de plástico de cultivo de tejido recubiertos de gelatina. Los cultivos se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂.

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

Citoblastos mesenquimatosos humanos (hMSC). Se compraron hMSC de Cambrex Incorporated (Walkersville, MD;

Lote números 2F1655, 2F1656 y 2F1657) y se cultivaron según las especificaciones del fabricante en medio MSCGM (Cambrex). Las células se cultivaron sobre plástico estándar cultivado con tejido a 37 °C con 5 % de CO₂.

5 *Células de médula ósea de las crestas ilíacas humanas (ICBM)*. Se recibió médula ósea de las crestas ilíacas humana de NDRI con consentimiento del paciente. La médula ósea se procesó según el método brevemente explicado por Ho, et al. (documento WO03/025149). La médula ósea se mezcló con tampón de lisis (NH₄Cl 155 mM, KHCO₃ 10 mM y EDTA 0,1 mM, pH 7,2) a una relación de 1 parte de médula ósea con respecto a 20 partes de tampón de lisis. La suspensión de células se agitó con vórtex, se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó durante 10 minutos a 500 x g. El sobrenadante se desechó y el sedimento de células se resuspendió en medio esencial mínimo alfa (Invitrogen) enriquecido con 10 % (v/v) de suero bovino fetal y glutamina 4 mM. Las células se centrifugaron de nuevo y el sedimento de células se resuspendió en medio fresco. Se contaron las células mononucleares viables usando exclusión con azul de tripano (Sigma, St. Louis, MO). Las células mononucleares se sembraron en matraces de plástico de tejido cultivado a 5 x 10⁴ células/cm². Las células se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ a tanto O₂ atmosférico estándar como a 5 % de O₂. Las células se cultivaron durante 5 días sin un cambio de medio. Se eliminó el medio y las células no adherentes después de 5 días de cultivo. Las células adherentes se mantuvieron en cultivo.

20 **Aislamiento de ARNm y análisis de GeneChip**. Se eliminaron cultivos de células activamente en crecimiento de los matraces con un raspador de células en solución salina tamponada con fosfato (PBS) fría. Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 300 x g. El sobrenadante se eliminó y las células se resuspendieron en PBS fresco y se centrifugaron de nuevo. El sobrenadante se eliminó y el sedimento de células se congeló inmediatamente y se guardó a -80 °C. Se extrajo ARNm celular y se transcribió en ADNc. Entonces, el ADNc se transcribió en ARNc y se marcó con biotina. El ARNc marcado con biotina se hibridó con matrices de oligonucleótidos GeneChip HG-U133A de Affymetrix (Affymetrix, Santa Clara CA). Las hibridaciones y la recogida de datos se realizaron según las especificaciones del fabricante. Las hibridación y la recogida de datos se realizaron según las especificaciones del fabricante. Los análisis de datos se realizaron usando el software informático "Significance Analysis of Microarrays" (SAM) versión 1.21 (Tusher, V.G. et al., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 5116-5121). Las licencias para el software de análisis están disponibles mediante la Office of Technology Licensing, Universidad de Stanford, y más información está disponible en la red mundial en el sitio web del Profesor Tibshirani en el Departamento de estadística, Universidad de Stanford (www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/).

Resultados

35 Se analizaron catorce poblaciones diferentes de células en este estudio. Las células junto con la información de los pases, sustrato de cultivo y medios de cultivo se enumeran en la Tabla 6-1.

Tabla 6-1. Células analizadas por el estudio de micromatrices. Las líneas de células se enumeran por su código de identificación junto con el pase en el momento del análisis, sustrato de crecimiento celular y medio de crecimiento.

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

65

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

5 La Tabla 6-2 muestra las distancias euclídeas que se calcularon para la comparación de los pares de células. Las distancias euclídeas se basaron en la comparación de las células basándose en los 290 genes que se expresaron diferencialmente entre los tipos de células. La distancia euclídea es inversamente proporcional a la similitud entre la expresión de los 290 genes.

10 **Tabla 6-2.** Distancias euclídeas para los pares de células. La distancia euclídea se calculó para los tipos de células usando los 290 genes que se expresaron diferencialmente entre los tipos de células. La similitud entre las células es inversamente proporcional a la distancia euclídea.

<i>Par de células</i>	Distancia Euclídea
ICBM-hMSC	24.71
Placenta-umbilical	25.52
ICBM-Fibroblasto	36.44
ICBM-placenta	37.09
Fibroblasto-MSC	39.63
ICBM-Umbilical	40.15
Fibroblasto-Umbilical	41.59
MSC-Placenta	42.84
MSC-Umbilical	46.86
ICBM-placenta	48.41

Las Tablas 6-3, 6-4 y 6-5 muestran la expresión de genes elevada en células derivadas de la placenta (Tabla 6-3), elevada en células derivadas del cordón umbilical (Tabla 6-4) y reducida en células derivadas del cordón umbilical y de la placenta (Tabla 6-5).

Tabla 6-3. Genes que tienen específicamente expresión elevada en las células derivadas de la placenta en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

Genes incrementados en células derivadas de Placenta		
ID conjunto pruebas	Nombre de Gen	NCBI Número de acceso
209732_at	C-type (calcium dependent, carbohydrate-recognition domain) lectin, superfamily member 2 (activation-induced)	AF070642
206067_s_at	Wilms tumor 1	NM_024426
207016_s_at	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2	AB015228
206367_at	Renin	NM_000537
210004_at	oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1	AF035776
214993_at	<i>Homo sapiens</i> , clone IMAGE:4179671, mRNA, partial cds	AF070642
202178_at	protein kinase C, zeta	NM_002744
209780_at	hypothetical protein DKFZp564F013	AL136883
204135_at	downregulated in ovarian cancer 1	NM_014890
213542_at	<i>Homo sapiens</i> mRNA; cDNA DKFZp547K1113 (from clone DKFZp547K1113)	AI246730

Tabla 6-4. Genes que se tienen específicamente expresión elevada en células derivadas del cordón umbilical en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

Genes incrementados en células derivadas de Umbilical		
ID conjunto pruebas	ID conjunto pruebas	ID conjunto pruebas
202859_x_at	Interleukin 8	NM_000584
211506_s_at	Interleukin 8	AF043337
210222_s_at	reticulon 1	BC000314
204470_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity)	NM_001511
206336_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2)	NM_002993
207850_at	Chemokine (C-X-C motif) ligand 3	NM_002090
203485_at	reticulon 1	NM_021136
202644_s_at	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	NM_006290

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Tabla 6-5. Genes que tienen expresión reducida en células del cordón umbilical y de la placenta en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

Genes incrementados en células derivadas de Placenta y de Umbilical		
ID conjunto pruebas	Nombre de Gen	NCBI Número de acceso
210135_s_at	short stature homeobox 2	AF022654.1
205824_at	heat shock 27kDa protein 2	NM_001541.1
209687_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (stromal cell-derived factor 1)	U19495.1
203666_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (stromal cell-derived factor 1)	NM_000609.1
212670_at	elastin (supravalvular aortic stenosis, Williams-Beuren syndrome)	AA479278
213381_at	<i>Homo sapiens</i> mRNA; cDNA DKFZp586M2022 (from clone DKFZp586M2022)	N91149
206201_s_at	mesenchyme homeobox 2 (growth arrest-specific homeobox)	NM_005924.1
205817_at	Sine oculis homeobox homolog 1 (<i>Drosophila</i>)	NM_005982.1
209283_at	crystallin, alpha B	AF007162.1
212793_at	dishevelled associated activator of morphogenesis 2	BF513244
213488_at	DKFZP586B2420 protein	AL050143.1
209763_at	similar to neuralin 1	AL049176
205200_at	Tetranectin (plasminogen binding protein)	NM_003278.1
205743_at	src homology three (SH3) and cysteine rich domain	NM_003149.1
200921_s_at	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	NM_001731.1
206932_at	cholesterol 25-hydroxylase	NM_003956.1
204198_s_at	runt-related transcription factor 3	AA541630
219747_at	hypothetical protein FLJ23191	NM_024574.1
204773_at	Interleukin 11 receptor, alpha	NM_004512.1
202465_at	Procollagen C-endopeptidase enhancer	NM_002593.2
203706_s_at	Frizzled homolog 7 (<i>Drosophila</i>)	NM_003507.1
212736_at	hypothetical gene BC008967	BE299456
214587_at	Collagen, type VIII, alpha 1	BE877796
201645_at	Tenascin C (hexabrachion)	NM_002160.1
210239_at	iroquois homeobox protein 5	U90304.1
203903_s_at	Hephaestin	NM_014799.1
205816_at	integrin, beta 8	NM_002214.1
203069_at	synaptic vesicle glycoprotein 2	NM_014849.1
213909_at	<i>Homo sapiens</i> cDNA FLJ12280 fis, clone MAMMA1001744	AU147799
206315_at	cytokine receptor-like factor 1	NM_004750.1

ES 2 564 044 T3

Genes incrementados en células derivadas de Placenta y de Umbilical			
ID conjunto pruebas	Nombre de Gen	NCBI Número de acceso	
5	204401_at	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 4	NM_002250.1
	216331_at	integrin, alpha 7	AK022548.1
10	209663_s_at	integrin, alpha 7	AF072132.1
	213125_at	DKFZP586L151 protein	AWO07573
	202133_at	transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ)	AA081084
15	206511_s_at	Sine oculis homeobox homolog 2 (<i>Drosophila</i>)	NM_016932.1
	213435_at	KIAA1034 protein	AB028957.1
	206115_at	early growth response 3	NM_004430.1
20	213707_s_at	distal-less homeobox 5	NM_005221.3
	218181_s_at	hypothetical protein FLJ20373	NM_017792.1
25	209160_at	aldo-keto reductase family 1, member C3 (3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type II)	AB018580.1
	213905_x_at	Biglycan	AA845258
	201261_x_at	Biglycan	BC002416.1
30	202132_at	transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ)	AA081084
	214701_s_at	fibronectin 1	AJ276395.1
35	213791_at	Proenkephalin	NM_006211.1
	205422_s_at	Integrin, beta-like 1 (with EGF-like repeat domains)	NM_004791.1
40	214927_at	<i>Homo sapiens</i> mRNA full length insert cDNA clone EUROIMAGE 1968422	AL359052.1
	206070_s_at	EphA3	AF213459.1
	212805_at	KIAA0367 protein	AB002365.1
45	219789_at	natriuretic peptide receptor C/guanylate cyclase C (atrionatriuretic peptide receptor C)	A1628360
	219054_at	hypothetical protein FLJ14054	NM_024563.1
50	213429_at	<i>Homo sapiens</i> mRNA; cDNA DKFZp564B222 (from clone DKFZp564B222)	AWO25579
	204929_s_at	vesicle-associated membrane protein 5 (myobrevin)	NM_006634.1
	201843_s_at	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	NM_004105.2
55	221478_at	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like	AL132665.1
	201792_at	AE binding protein 1	NM_001129.2
60	204570_at	cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 1 (muscle)	NM_001864.1
	201621_at	neuroblastoma, suppression of tumorigenicity 1	NM_005380.1
65	202718_at	Insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa	NM_000597.1

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

Tabla 6-6. Genes que tienen expresión elevada en fibroblastos en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

5
10
15
20
25
30
35
40
45

Genes incrementados en Fibroblastos	
	dual specificity phosphatase 2
	KIAA0527 protein
	<i>Homo sapiens</i> cDNA: FLJ23224 fis, clone ADSU02206
	dynein, cytoplasmic, intermediate polypeptide 1
	ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G)
	inhibin, beta A (activin A, activin AB alpha polypeptide)
	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 4 (putative function)
	KIAA1053 protein
	microtubule-associated protein 1A
	zinc finger protein 41
	HSPC019 protein
	<i>Hobo sapiens</i> cDNA: FLJ23564 fis, clone LNG10773
	<i>Homo sapiens</i> mRNA; cDNA DKFZp564A072 (from clone DKFZp564A072)
	LIM protein (similar to rat protein kinase C-binding enigma)
	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase complex-associated protein
	hypothetical protein FLJ22004
	Human (clone CTG-A4) mRNA sequence
	ESTs, Moderately similar to cytokine receptor-like factor 2; cytokine receptor CRL2 precursor [<i>Homo sapiens</i>]
	transforming growth factor, beta 2
	hypothetical protein MGC29643
	antigen identified by monoclonal antibody MRC OX-2
	putative X-linked retinopathy protein

Tabla 6-7. Genes que tienen expresión elevada en las células derivadas de ICBM en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

50
55
60
65

Genes Incrementados en Células ICBM	
	•cardiac ankyrin repeat protein
	•MHC class I region ORF
	•integrin, alpha 10
	•hypothetical protein FLJ22362
	•UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 (GalNAc-T3)
	•interferon-induced protein 44
	•SRY (sex determining region Y)-box 9 (campomelic dysplasia, autosomal sex-reversal)
	•keratin associated protein 1-1
	•hippocalcin-like 1
	•jagged 1 (Alagille syndrome)
	•proteoglycan 1, secretory granule

Tabla 6-8. Genes que tienen expresión elevada en las células MSC en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

Genes Incrementados en Células MSC	
5	<ul style="list-style-type: none"> •interleukin 26 •maltase-glucoamilase (alpha-glicosidase)
10	<ul style="list-style-type: none"> •nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2 •v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog •hypothetical protein DC42
15	<ul style="list-style-type: none"> •nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2 •FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B •WNT1 inducible signaling pathway protein 1 •MCF.2 cell line derived transforming sequence
20	<ul style="list-style-type: none"> •potassium channel, subfamily K, member 15 •cartilage paired-class homeoprotein 1 •<i>Homo sapiens</i> cDNA FLJ12232 fis, clone MAMMA1001206 •<i>Homo sapiens</i> cDNA FLJ34668 fis, clone LIVER2000775 •jun B proto-oncogene •B-cell CLL/lymphoma 6 (zinc finger protein 51) •zinc finger protein 36, C3H type, homolog (mouse)

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

Los análisis revelaron que estuvieron presentes transcritos para 290 en diferentes cantidades en estos cinco tipos diferentes de células. Estos genes incluyen diez genes que son específicamente elevados en las células derivadas de la placenta y siete genes específicamente elevados en las células derivadas del cordón umbilical. Se encontró que cincuenta y cuatro genes tenían niveles de expresión específicamente menores en placenta y cordón umbilical.

La expresión de genes seleccionados se ha confirmado por PCR, como se muestra en el Ejemplo 7. Células derivadas del posparto generalmente, y células derivadas de umbilical, en particular, tienen perfiles de expresión génica distintos, por ejemplo, en comparación con otras células humanas, tales como las células derivadas de la médula ósea y los fibroblastos probados aquí.

EJEMPLO 7

Marcadores de células en células derivadas del cordón umbilical

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

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

Métodos y material

Células. Células derivadas del cordón umbilical (cuatro aislados) y fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF; neonatales y adultos) se cultivaron en medio de crecimiento en matraces T75 recubiertos de gelatina. Se cultivaron citoblastos mesenquimatosos (MSC) en el kit Bullet de medio de crecimiento de citoblastos mesenquimatosos (MSCGM; Cambrex, Walkerville, MD).

Para experimentos de IL-8, las células se descongelaron del nitrógeno líquido y se sembraron en matraces recubiertos de gelatina a 5.000 células/cm², se cultivaron durante 48 horas en medio de crecimiento y luego se cultivaron durante 8 horas adicionales en 10 mililitros de medio de privación de suero [DMEM-bajo en glucosa (Gibco, Carlsbad, CA), penicilina (50 unidades/mililitro), estreptomycin (50 microgramos/mililitro) (Gibco, Carlsbad,

CA) y 0,1 % (peso/volumen) de albúmina de suero bovino (BSA; Sigma, St. Louis, MO)]. A continuación se extrajo el ARN y los sobrenadantes se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos para eliminar residuos celulares. Los sobrenadantes se congelaron a -80 °C hasta el análisis de ELISA.

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

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

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

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

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

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

45 **PCR en tiempo real.** Se realizó PCR en muestras de ADNc usando productos de expresión génica comercializados bajo la marca registrada de productos de expresión génica ASSAYS-ON-DEMAND (Applied Biosystems): Se mezclaron receptor de LDL oxidadas (Hs00234028); renina (Hs00166915); reticulón (Hs00382515); ligando 3 de CXC (Hs00171061); GCP-2 (Hs00605742); IL-8 (Hs00174103); y GAPDH con ADNc y la mezcla maestra de PCR TaqMan Universal según las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems) usando un sistema de detección de secuencias 7000 con el software ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems). Las condiciones de los ciclos térmicos fueron inicialmente 50 °C durante 2 minutos y 95 °C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto. Los datos de PCR se analizaron según las especificaciones del fabricante (Boletín del usuario n° 2 de Applied Biosystems para el sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700).

55 **PCR convencional.** Se realizó PCR convencional usando un ABI PRISM 7700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Boston, MA) para confirmar los resultados de la PCR en tiempo real. Se realizó PCR usando 2 microlitros de disolución de ADNc (1 x tampón de reacción de PCR de mezcla universal Taq polimerasa (nombre comercial AMPLITAQ GOLD) (Applied Biosystems) y desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos. La amplificación se optimizó para cada conjunto de cebadores: para IL-8, ligando 3 de CXC y reticulón (94 °C durante 15 segundos, 55 °C durante 15 segundos y 72 °C durante 30 segundos durante 30 ciclos); para renina (94 °C durante 15 segundos, 53 °C durante 15 segundos y 72 °C durante 30 segundos durante 38 ciclos); para receptor de LDL oxidadas y GAPDH (94 °C durante 15 segundos, 55 °C durante 15 segundos y 72 °C durante 30 segundos durante 33 ciclos). Los cebadores usados para la amplificación se enumeran en la Tabla 1. La concentración de cebador en la reacción de PCR final fue 1 micromolar, excepto para GAPDH que fue 0,5 micromolar. Los cebadores de GAPDH fueron los mismos que para PCR en tiempo real, excepto que la sonda TaqMan del fabricante no se añadió a la reacción de PCR final. Las muestras se separaron sobre 2 % (peso/volumen) de gel de agarosa y se tiñeron con bromuro de etidio (Sigma, St. Louis, MO). Las imágenes se capturaron sobre película 667 (Universal Twinpack VWR International, South Plainfield, NJ) usando una cámara POLAROID de longitud focal fija (VWR International, South
65

Plainfield, NJ).

Tabla 7-1: Cebadores usados

5	Nombre Cebador	Cebador
	Receptor de LDL oxidado	S: 5'- GAGAAATCCAAAGAGCAAATGG-3' (SEQ ID NO:1) A: 5'-AGAATGGAAAAGCTGGAATAGG -3' (SEQ ID NO:2)
	Renina	S: 5'-TCTTCGATGCTTCGGATTCC -3' (SEQ ID NO:3) A: 5'-GAATTCTCGGAATCTCTGTTG -3' (SEQ ID NO:4)
10	Reticulon	S: 5'- TTACAAGCAGTGCAGAAAACC-3' (SEQ ID NO:5) A: 5'- AGTAAACATTGAAACCACAGCC-3' (SEQ ID NO:6)
	Interleucina-8	S: 5'- TCTGCAGCTCTGTGTGAAGG-3' (SEQ ID NO:7) A: 5'-CTTCAAAAAGCTTCTCCACAACC- 3' (SEQ ID NO:8)
15	Quimioquinas (CXC) ligando 3	S: 5'- CCCACGCCACGCTCTCC-3' (SEQ ID NO:9) A: 5'-TCCTGTCTAGTTGGTGTCTCC -3' (SEQ ID NO:10)

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

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

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

40 **Análisis de FACS.** Se lavaron células adherentes en matraces en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) y se desprendieron con tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, CA). Las células se recogieron, se centrifugaron y se resuspendieron en 3 % (v/v) de FBS en PBS a una concentración de 1x10⁷ células/mililitro. Se suministraron alícuotas de cien microlitros a tubos cónicos. Las células teñidas para antígenos intracelulares se permeabilizaron con Perm/tampón de lavado (BD Pharmingen, San Diego, CA). Se añadió anticuerpo a alícuotas según especificaciones del fabricante, y las células se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos a 4 °C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar el exceso de anticuerpo. Las células que requieren un anticuerpo secundario se resuspendieron en 100 microlitros de 3 % de FBS. Se añadió anticuerpo secundario según la especificación del fabricante, y las células se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos a 4 °C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar el exceso de anticuerpo secundario. Las células lavadas se resuspendieron en 0,5 mililitros de PBS y se analizaron por

citometría de flujo. Se usaron los siguientes anticuerpos: receptor 1 de LDL oxidadas (sc-5813; Santa Cruz, Biotech), GROalfa (555042; BD Pharmingen, Bedford, MA), IgG1 kappa de ratón (P-4685 y M-5284; Sigma), IgG de burro contra cabra (sc-3743; Santa Cruz, Biotech.). Los análisis de citometría de flujo se realizaron con FACSCalibur (Becton Dickinson San Jose, CA).

Resultados

Los resultados de la PCR en tiempo real para genes “distintivos” seleccionados realizados sobre ADNc de células derivadas de cordón umbilical humano, fibroblastos adultos y neonatales, y citoblastos mesenquimatosos (MSC), indican que tanto la expresión de reticulón como del receptor de LDL oxidadas fue mayor en células derivadas del cordón umbilical en comparación con otras células. Los datos obtenidos de PCR en tiempo real se analizaron por el método de $\Delta\Delta CT$ y se expresaron en una escala logarítmica. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión del ligando 3 de CXC y GCP-2 entre células posparto y controles. Los resultados de PCR en tiempo real se confirmaron por PCR convencional. La secuenciación de productos de PCR validó adicionalmente estas observaciones. No se encontró diferencia significativa en el nivel de expresión del ligando 3 de CXC entre células posparto y controles usando cebadores para el ligando 3 de CXC para PCR convencional enumerados en la Tabla 7-1.

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

Después del crecimiento en medio sin suero, los medios acondicionados se examinaron para la presencia de IL-8. Las mayores cantidades de IL-8 se detectaron en medios en los que se habían cultivado células umbilicales (Tabla 7-2). No se detectó IL-8 en medio en el que se habían cultivado fibroblastos dérmicos humanos.

Tabla 7-2: Expresión de proteínas IL-8 medida por ELISA

Tipo célula	IL-8 secreción
hFibro	ND
UMBC Aislado 1	2058.42 \pm 144.67
UMBC Aislado 2	2368.86 \pm 22.73
Los resultados del ensayo ELISA para interleucina-8 (IL-8) realizaron en medio gastado en el que se habían cultivado células derivadas umbilicus- y fibroblastos de piel humana. Los valores se presentan aquí son pg / millones células, n = 2, sem.	
ND: No detectado	

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

Se investigó la expresión de GROalfa, GCP-2, receptor 1 de LDL oxidadas y reticulón en células derivadas del cordón umbilical en el pase 11 por inmunocitoquímica.

Resumen. Se ha establecido la concordancia entre niveles de expresión génica medida por micromatriz y PCR (tanto en tiempo real como convencional) para cuatro genes: receptor 1 de LDL oxidadas, renina, reticulón e IL-8. La expresión de estos genes se reguló al nivel de ARNm en células posparto. IL-8 también se reguló al nivel de proteína. Las diferencias en la expresión de GCP-2 y ligando 3 de CXC no se confirmaron al nivel de ARNm.

Células derivadas del cordón umbilical humano en el pase 0 se sondaron para la expresión de alfa-actina de músculo liso y vimentina, y dieron positivo para ambas. El patrón de tinción se preservó hasta el pase 11, sugiriendo que la expresión de vimentina y alfa-actina de músculo liso se preservan en células con pases, al menos en el medio de crecimiento usado.

EJEMPLO 8

Caracterización inmunohistoquímica de fenotipos de células del cordón umbilical

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

Materiales y métodos

5 **Preparación de tejido.** Se recogió tejido del cordón umbilical humano y se fijó por inmersión en 4 % (peso/volumen) de paraformaldehído durante la noche a 4 °C. Se realizó inmunohistoquímica usando anticuerpos dirigidos contra los siguientes epítopes (véase la Tabla 8-1): vimentina (1:500; Sigma, St. Louis, MO), desmina (1:150, producida contra conejo; Sigma; o 1:300, producida contra ratón; Chemicon, Temecula, CA), alfa-actina de músculo liso (SMA; 1:400; Sigma), citoqueratina 18 (CK18; 1:400; Sigma), factor de von Willebrand (vWF; 1:200; Sigma) y CD34 (clase III de CD34 humano; 1:100; DAKOCytomation, Carpinteria, CA). Además, se probaron los siguientes marcadores: anti-GROalfa humana - PE (1:100; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), anti-GCP-2 humana (1:100; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), anti-receptor 1 de LDL oxidadas humano (ox-LDL R1; 1:100; Santa Cruz Biotech) y anti-NOGO-A humana (1:100; Santa Cruz Biotech). Los especímenes fijados se cortaron con un bisturí y se colocaron dentro de compuesto de incorporación OCT (Tissue-Tek OCT; Sakura, Torrance, CA) sobre un baño de nieve carbónica que contenía etanol. Entonces, los bloques congelados se seccionaron (10 micrómetros de espesor) usando un criótomo estándar (Leica Microsystems) y se montaron sobre portaobjetos de vidrio para tinción.

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

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

Tabla 8-1: Resumen de los anticuerpos primarios usados

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

Resultados

60 **Caracterización del cordón umbilical.** Los marcadores vimentina, desmina, SMA, CK18, vWF y CD34 se expresaron en un subconjunto de células encontrado dentro del cordón umbilical. En particular, la expresión de vWF y CD34 se limitó a los vasos sanguíneos contenidos dentro del cordón. Las células CD34+ estuvieron en la capa más interna (lado de la luz). La expresión de vimentina se encontró en toda la matriz y los vasos sanguíneos del cordón. SMA se limitó a la matriz y paredes externas de la arteria y vena, pero no estuvo contenida con los propios

vasos. CK18 y desmina se observaron dentro de los vasos solo, estando la desmina limitada a las capas medias y externas.

Resumen. Vimentina, desmina, alfa-actina de músculo liso, citoqueratina 18, factor de von Willebrand y CD34 se producen en células dentro de cordón umbilical humano.

EJEMPLO 9

Secreción de factores tróficos por células derivadas del cordón umbilical

Se midió la secreción de factores tróficos seleccionados de PPDC derivadas del cordón umbilical. Se seleccionaron factores que tenían actividad angiogénica (es decir, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (Rosen et al. (1997) Ciba Found. Symp. 212:215-26), proteína 1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1) (Salcedo et al. (2000) Blood 96:34-40), interleucina-8 (IL-8) (Li et al. (2003) J. Immunol. 170:3369-76), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Hughes et al. (2004) Ann. Thorac. Surg. 77:812-8), inhibidor de tejido de metaloproteínasa 1 de matriz (TIMP1), angiopoyetina 2 (ANG2), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-bb), trombopoyetina (TPO), factor de crecimiento epidérmico de unión a la heparina (HB-EGF), factor 1a derivado del estroma (SDF-1a)), actividad neurotrófica/neuroprotectora (factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Cheng et al. (2003) Dev. Biol. 258:319-33), interleucina-6 (IL-6), proteína-2 quimiotáctica de granulocitos (GCP-2), factor de crecimiento beta2 transformante (TGFbeta2)) o actividad de quimiocinas (proteína 1a inflamatoria de macrófagos (MIP1alfa), proteína 1beta inflamatoria de macrófagos (MIP1beta), monocito quimioatrayente-1 (MCP-1), Rantes (expresada y secretada por linfocitos T normales regulados tras la activación), I309, quimiocina del timo y regulada por la activación (TARC), eotaxina, quimiocina derivada de macrófagos (MDC), IL-8).

Métodos y materiales

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

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

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

Ensayo de ELISA SearchLight Multiplexed. Se midieron quimiocinas (MIP1alfa, MIP1beta, MCP-1, Rantes, I309, TARC, eotaxina, MDC, IL8), BDNF y factores angiogénicos (HGF, KGF, bFGF, VEGF, TIMP1, ANG2, PDGF-bb, TPO, HB-EGF) usando matrices del proteoma SearchLight (Pierce Biotechnology Inc.). Las matrices del proteoma son ELISA de sándwich multiplexados para la medición cuantitativa de dos a dieciséis proteínas por pocillo. Las matrices se producen aplicando en puntos un patrón de 2 x 2, 3 x 3 o 4 x 4 de cuatro a dieciséis anticuerpos de captura diferentes en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Tras un procedimiento de ELISA de sándwich, se obtienen imágenes de la placa entera para capturar la señal quimioluminiscente generada en cada mancha dentro de cada pocillo de la placa. La señal generada en cada mancha es proporcional a la cantidad de proteína diana en el patrón original o muestra.

Resultados

Ensayo de ELISA. Se secretaron MCP-1 y IL-6 por PPDC derivadas del cordón umbilical y fibroblastos dérmicos (Tabla 9-1). Se secretaron SDF-1alfa y GCP-2 por fibroblastos. Se secretaron GCP-2 y IL-8 por PPDC derivadas del cordón umbilical. TGF-beta2 no se detectó a partir de ningún tipo de célula por ELISA.

Tabla 9-1. Resultados de ELISA: Detección de factores tróficos

	MCP-1	IL-6	VEGF	SDF-1α	GCP-2	IL-8	TGF-beta2
Fibroblasto	17 \pm 1	61 \pm 3	29 \pm 2	19 \pm 1	21 \pm 1	ND	ND
Umbilical (022803)	1150 \pm 74	4234 \pm 289	ND	ND	160 \pm 11	2058 \pm 145	ND
Umbilical (071003)	2794 \pm 84	1356 \pm 43	ND	ND	2184 \pm 98	2369 \pm 23	ND

Clave: ND: No Detectado., =/- sem

Ensayo de ELISA SearchLight Multiplexed. Se secretaron TIMP1, TPO, KGF, HGF, FGF, HBEGF, BDNF, MIP1beta, MCP1, RANTES, I309, TARC, MDC y IL-8 de PPDC derivadas del cordón umbilical (Tablas 9-2 y 9-3). No se detectaron Ang2, VEGF o PDGFbb.

Tabla 9-2. Resultados del ensayo de ELISA SearchLight Multiplexed

	TIMP1	ANG2	PDGFbb	TPO	KGF	HGF	FGF	VEGF	HBEGF	BDNF
hFB	19306.3	ND	ND	230.5	5.0	ND	ND	27.9	1.3	ND
U1	57718.4	ND	ND	1240.0	5.8	559.3	148.7	ND	9.3	165.7
U3	21850.0	ND	ND	1134.5	9.0	195.6	30.8	ND	5.4	388.6

Clave: elevación (fibroblastos humanos), U1 (derivados del ombligo PPDC (022803)), U3 (derivados del ombligo PPDC (071003)). ND: No Detectado.

Tabla 9-3. Resultados del ensayo de ELISA SearchLight Multiplexed

	MIP1a	MIP1b	MCP1	RANTES	I309	TARC	Eotaxin	MDC	IL8
hFB	ND	ND	39.6	ND	ND	0.1	ND	ND	204.9
U1	ND	8.0	1694.2	ND	22.4	37.6	ND	18.9	51930.1
U3	ND	5.2	2018.7	41.5	11.6	21.4	ND	4.8	10515.9

Clave: hFB (fibroblastos humanos), U1 (derivados del ombligo PPDC (022803)), U3 (derivados del ombligo PPDC (071003)). ND: No Detectados.

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

EJEMPLO 10

Inmunología *in vitro*

Se evaluaron *in vitro* líneas celulares posparto para sus características inmunológicas en un esfuerzo por predecir la respuesta inmunológica, si la hay, que estas células provocarían tras el trasplante *in vivo*. Las líneas celulares posparto se ensayaron por citometría de flujo para la expresión de HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86 y B7-H2. Estas proteínas se expresan por células presentadoras de antígeno (APC) y se requieren para la estimulación directa de linfocitos T CD4⁺ sin tratamiento previo (Abbas & Lichtman, CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY, 5th Ed. (2003) Saunders, Philadelphia, p. 171). Las líneas celulares también se analizaron por citometría de flujo para la expresión de HLA-G (Abbas & Lichtman, CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY, 5th Ed. (2003) Saunders, Philadelphia, p. 171), CD 178 (Coumans et al., (1999) Journal of Immunological Methods 224, 185-196) y PD-L2 (Abbas & Lichtman, CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY, 5th Ed. (2003) Saunders, Philadelphia, p. 171; Brown, et al. (2003) The Journal of Immunology 170, 1257-1266). Se cree que la expresión de estas proteínas por células que residen en tejidos placentarios media en el estado inmunoprivilegiado de tejidos placentarios en el útero. Para predecir el grado al que las líneas celulares posparto derivadas del cordón umbilical provocan una respuesta inmunitaria *in vivo*, las líneas celulares se probaron en una reacción de linfocitos mixtos (MLR) unilateral.

Materiales y métodos

Cultivo celular. Se cultivaron células en medio de crecimiento en matraces T75 (Corning, Corning, NY) recubiertos con 2 % de gelatina (Sigma, St. Louis, MO) hasta que fueron confluentes.

Tinción de anticuerpos. Las células se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) y se desprendieron con tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, MO). Las células se recogieron, se centrifugaron y se resuspendieron en 3 % (v/v) de FBS en PBS a una concentración de células de 1×10^7 por mililitro. Se añadió anticuerpo (Tabla 10-1) a cien microlitros de suspensión de células según las especificaciones del fabricante y se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos a 4 °C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar el anticuerpo sin unir. Las células se resuspendieron en quinientos microlitros de PBS y se analizaron por citometría de flujo usando un instrumento FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Tabla 10-1. Anticuerpos

Anticuerpo	Fabricación	Número Catálogo
HLA-DR,DP,DQ	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555558
CD80	BD Pharmingen	557227
CD86	BD Pharmingen	555665
B7-H2	BD Pharmingen	552502
HLA-G	Abcam (Cambridgeshire, UK)	ab 7904-100
CD178	Santa Cruz (San Cruz, CA)	sc-19681
PD-L2	BD Pharmingen	557846
Ratón IgG2alfa	Sigma (St. Louis, MO)	F-6522
Ratón IgG1kappa	Sigma	P-4685

Reacción de linfocitos mixtos. Viales criopreservados de PPDC derivadas del cordón umbilical del pase 10 etiquetadas como la línea celular "A" se enviaron sobre nieve carbónica a CTBR (Senneville, Quebec) para realizar una reacción de linfocitos mixtos usando CTBR SOP no. CAC-031. Se recogieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de múltiples donantes voluntarios masculinos y femeninos. Se cribaron seis donantes de sangre voluntarios humanos para identificar un único donante alógeno que presentara una robusta respuesta de proliferación en una reacción de linfocitos mixtos con los otros cinco donantes de sangre. Este donante se seleccionó como el donante de control positivo alógeno. Los cinco donantes de sangre restantes se seleccionaron como receptores. Se trataron PBMC alógenas estimulantes (donantes), PBMC autólogas y líneas celulares posparto con mitomicina C. Las células estimulantes autólogas y tratadas con mitomicina C se añadieron a PBMC respondedoras (receptoras) y se cultivaron durante 4 días. Después de la incubación, se añadió [³H]timidina a cada muestra y se cultivaron durante 18 horas. Tras la recogida de las células, se extrajo ADN radiomarcado, y la incorporación de [³H]-timidina se midió usando un contador de centelleo. Las reacciones se realizaron por triplicado usando placas de cultivo de dos células con tres receptores por placa

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

Resultados

Reacción de linfocitos mixtos - Células derivadas del cordón umbilical. Los resultados se muestran a continuación en las Tablas 10-2 y -3. El índice de estimulación promedio osciló de 6,5 (placa 1) a 9 (placa 2) y los controles positivos de donante alógeno oscilaron de 42,75 (placa 1) a 70 (placa 2) (Tabla 10-3).

Tabla 10-2. Datos de la reacción de linfocitos mixtos - Línea celular A (cordón umbilical)

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

ES 2 564 044 T3

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

Tabla 10-3. Índice de estimulación promedio de células umbilicales y un donante alógeno en una reacción de linfocitos mixtos con cinco receptores alógenos individuales.

Índice de Estimulación Promedio		
	Recipiente	Umbilical
Plato 1 (recibidores 1-4)	42.75	6.5
Plato 2 (recibidor 5)	70	9

Marcadores de células presentadoras de antígeno producidos por células derivadas del cordón umbilical.

Los histogramas del análisis de citometría de flujo muestran que las células umbilicales fueron negativas para la producción de HLA-DR, DP, DQ, CD80, CD86 y B7-H2, debido a que los valores de fluorescencia fueron comparables al control de IgG. Esto indica que las líneas celulares umbilicales carecen de las moléculas de la superficie celular requeridas para estimular directamente linfocitos T CD4⁺.

Marcadores inmunomoduladores en células derivadas del cordón umbilical. Las células umbilicales analizadas por citometría de flujo fueron positivas para la expresión de PD-L2, como se refleja en el aumento en la fluorescencia con respecto al control de IgG. Las células fueron negativas para la expresión de CD178 y HLA-G, como se indica por valores de fluorescencia de acuerdo con el control de IgG.

Resumen. En las reacciones de linfocitos mixtos realizadas con líneas celulares umbilicales, el índice de estimulación promedio osciló de 6,5 a 9, mientras que el de los controles positivos alógenos osciló de 42,75 a 70. Las líneas celulares umbilicales no expresaron cantidades detectables de las proteínas estimulantes HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86 y B7-H2, como se mide por citometría de flujo. Las líneas celulares umbilicales tampoco expresaron las proteínas inmunomoduladoras HLA-G y CD178, pero la expresión de PD-L2 se detectó por citometría de flujo. Las PBMC de donante alógeno contienen células presentadoras de antígeno que expresan HLA-DR, DQ, CD8, CD86 y B7-H2, permitiendo así la estimulación de linfocitos alógenos. La ausencia en las células derivadas del cordón umbilical de moléculas de la superficie de células presentadoras de antígeno requeridas para la estimulación directa de linfocitos T CD4⁺ sin tratamiento previo, además de la presencia de PD-L2, una proteína inmunomoduladora, podría explicar el bajo índice de estimulación presentado por estas células en una MLR en comparación con controles alógenos.

EJEMPLO 11

Ensayo de coagulación del plasma

Pueden inyectarse células útiles para la terapia sistémicamente para ciertas aplicaciones en las que las células pueden dirigirse al sitio de acción. Es importante que las células inyectadas no produzcan trombosis, ya que puede ser letal. El factor de tejido, una glucoproteína procoagulante unida a la membrana, es el iniciador de la cascada de coagulación extrínseca, que es la vía de coagulación predominante *in vivo*. El factor de tejido también desempeña una función importante en la formación de vasos embrionarios, por ejemplo, en la formación de la pared vascular primitiva (Brodsky et al. (2002) Exp. Nephrol. 10:299-306). Para determinar las posibilidades de las PPDC para iniciar la coagulación, PPDC derivadas del cordón umbilical se evaluaron para la expresión del factor de tejido y su capacidad para iniciar la coagulación del plasma.

Métodos y materiales

Factor de tejido humano. Se reconstituyó factor de tejido humano (SIMPLASTIN Organon Teknika Corporation, Durham, NC), con 20 mililitros de agua destilada. La disolución madre se diluyó sucesivamente (1:2) en ocho tubos. Se descongeló plasma humano normal (George King BioMedical, Overland Park, KS) a 37 °C en un baño de agua y a continuación se guardó en hielo antes de uso. Se añadieron 100 microlitros de solución salina tamponada con fosfato (PBS), 10 microlitros de SIMPLASTIN diluido, 30 microlitros de cloruro de calcio 0,1 molar y 100 microlitros de plasma humano normal a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Un pocillo de control negativo no recibió SIMPLASTIN. La placa se colocó inmediatamente en un lector de microplacas de temperatura controlada y la absorbancia se midió a 405 nanómetros a intervalos de 40 segundos durante 30 minutos.

Células J-82 y derivadas del cordón umbilical. Se cultivaron células J-82 (ATCC, MD) en medio Dulbecco modificado por Iscove (IMDM; Gibco, Carlsbad, CA) que contenía 10 % (v/v) de suero bovino fetal (FBS; Hyclone, Logan UT), piruvato de sodio 1 milimolar (Sigma Chemical, St. Louis, MO), L-glutamina 2 milimolar (Mediatech Herndon, VA), 1 x aminoácidos no esenciales (Mediatech Herndon, VA). A aproximadamente el 70 % de confluencia, las células se transfirieron a 100.000, 50.000 y 25.000 células/pocillo a pocillos de placa de 96 pocillos. Las células derivadas del cordón umbilical se cultivaron en medio de crecimiento en matraces T75 recubiertos de gelatina (Corning, Corning, NY). Las células derivadas del cordón umbilical en el pase 18 se transfirieron a pocillos a una densidad de 50.000 células/pocillo. Se eliminó medio de cultivo de cada pocillo después de la centrifugación a 150 x g durante 5 minutos. Las células se suspendieron en PBS sin calcio y magnesio. Las células se incubaron con

anticuerpo anti-factor de tejido, las células se incubaron con 20 microgramos/mililitro de CNTO 859 (Centocor, Malvern, PA) durante 30 minutos. Se añadió cloruro de calcio (30 microlitros) a cada pocillo. La placa se sembró inmediatamente en un lector de microplacas de temperatura controlada y se midió la absorbancia a 405 nanómetros a intervalos de 40 segundos durante 30 minutos.

Tinción de anticuerpos. Las células se lavaron en PBS y se desprendieron del matraz con tripsina/EDTA (Gibco Carlsbad, CA). Las células se recogieron, se centrifugaron y se resuspendieron en 3 % (v/v) de FBS en PBS a una concentración de células de 1×10^7 por mililitro. Se añadió anticuerpo a 100 microlitros de suspensión de células según las especificaciones del fabricante. Las células se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos a 4 °C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS, a continuación se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos para eliminar el anticuerpo sin unir. Las células se resuspendieron en 100 microlitros de 3 % de FBS y se añadió anticuerpo secundario según las instrucciones del fabricante. Las células se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos a 4 °C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar el anticuerpo secundario no unido. Las células lavadas se resuspendieron en 500 microlitros de PBS y se analizaron por citometría de flujo.

Análisis de citometría de flujo. El análisis de citometría de flujo se realizó con un instrumento FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Resultados

El análisis de citometría de flujo reveló que las células posparto derivadas del cordón umbilical son menos activas en promover la coagulación del plasma que las células J82. Aunque un ensayo de coagulación del plasma demostró que el factor de tejido presente en las células derivadas del cordón umbilical era activo, la coagulación duró más que con las células J-82, como se prueba por el mayor tiempo hasta la absorbancia al 50 % (T $\frac{1}{2}$ hasta el máx; Tabla 11-1). El T $\frac{1}{2}$ hasta el máx es inversamente proporcional al número de células J-82. Las células derivadas del cordón umbilical disminuyeron la tasa de coagulación como se indica por el T $\frac{1}{2}$ hasta el máx. La coagulación se observó con tanto células sometidas a pases tempranos (P5) como tardíos (P18). La preincubación de células umbilicales con CNTO 859, un anticuerpo para factor de tejido, inhibió la reacción de coagulación estableciendo que el factor de tejido era responsable de la coagulación.

Tabla 11-1. El efecto del factor de tejido humano (Simplastin®) y las células derivadas del cordón umbilical (Umb) sobre la coagulación del plasma. El tiempo hasta la absorbancia al 50 % (T $\frac{1}{2}$ hasta el máx.) en la meseta en segundos se usó como unidad de medición.

Estandar (Disolución Simplastin®)	T $\frac{1}{2}$ a máx. (segundos)
1:2	61
1:4	107
1:8	147
1:16	174
1:32	266
1:64	317
1:128	378
0 (control negativo)	1188
Células J-82	
100,000	122
50,000	172
25,000	275
Umb P5	
50,000	833
Umb P18	
50,000	443

Resumen. PPDC derivadas del cordón umbilical producen algo de factor de tejido, pero la adición de un anticuerpo contra el factor de tejido puede inhibir la actividad de coagulación del factor de tejido. El factor de tejido normalmente se encuentra en células en una conformación que es inactiva, pero que se activa por tensión mecánica o química (por ejemplo, LPS) (Sakariassen et al. (2001) Thromb. Res. 104:149-74; Engstad et al. (2002) Int. Immunopharmacol. 2:1585-97). Así, la minimización de la tensión durante el proceso de preparación de las PPDC puede prevenir la activación del factor de tejido. Además de la actividad trombogénica, el factor de tejido se ha asociado a actividad angiogénica. Por este motivo, la actividad del factor de tejido puede ser beneficiosa cuando las PPDC derivadas del cordón umbilical se trasplantan en tejido, pero deben inhibirse cuando las PPDC se inyectan intravenosamente.

EJEMPLO 12

Trasplante de células derivadas del cordón umbilical

Células posparto derivadas del cordón umbilical son útiles para terapias regenerativas. Se evaluó el tejido producido por ratones SCID tras el trasplante de un material biodegradable con y sin las células derivadas del cordón umbilical. Los materiales evaluados fueron andamiajes no tejidos de VICRYL, 35/65 espuma de PCL/PGA y un hidrogel de péptidos de auto-ensamblaje.

Métodos y materiales

Cultivo celular. Se cultivaron células derivadas del cordón umbilical en medio de crecimiento en matraces recubiertos de gelatina.

Preparación de matrices. Se preparó un andamiaje de no tejido usando una técnica de perforación con agujas tradicional como se describe más adelante. Fibras, comprendidas de un copolímero de ácidos glicólico y láctico (PGA/PLA) absorbible sintético, comercializadas bajo el nombre comercial VICRYL, se obtuvieron de Ethicon, Inc. (Somerville, NJ). Las fibras fueron filamentos de aproximadamente 20 micrómetros de diámetro. Las fibras se cortaron y plegaron en longitudes sustancialmente uniformes de 2 pulgadas para formar fibras cortadas de 2 pulgadas. Se preparó una matriz de no tejido perforada con agujas dispuesta en seco utilizando las fibras cortadas VICRYL. Las fibras cortadas se abrieron y se cardaron en maquinaria de no tejido estándar. La estera resultante estuvo en forma de fibras cortadas palmeadas. Las fibras cortadas palmeadas se perforaron con agujas para formar el andamiaje de no tejido perforado con agujas dispuesto en seco. El andamiaje de no tejido se aclaró en agua, seguido de otra incubación en etanol para eliminar cualquier producto químico residual o auxiliares de procesamiento usados durante el proceso de fabricación.

Espumas, compuestas de 35/65 de copolímero de poli(épsilon-caprolactona)/poli(ácido glicólico) (35/65 de PCL/PGA), se formaron por el proceso de liofilización, como se describe en la patente de EE.UU. N° 6.355.699.

Se obtuvo un hidrogel de péptidos de auto-ensamblaje (péptidos de auto-ensamblaje RAD16 (3D Matrix, Cambridge, MA)) como una disolución estéril al 1 % (peso/volumen) en agua.

Preparación de muestras. Se sembraron un millón de células viables en 15 microlitros de medio de crecimiento sobre andamiajes de no tejido de VICRYL de 5 milímetros de diámetro, 2,25 milímetros de espesor (64,33 miligramos/cc) o discos de espuma 35/65 de PCL/PGA de 5 milímetros de diámetro. Se dejó que las células se unieran durante dos horas antes de añadir más medio de crecimiento para cubrir los andamiajes. Las células se cultivaron sobre andamiajes durante la noche. Los andamiajes de control sin células también se incubaron en medio.

Se mezcló la disolución de péptidos de auto-ensamblaje 1:1 con 1×10^6 células en 10 % (peso/volumen) de sacarosa (Sigma, St Louis, MO), HEPES 10 milimolar (pH aproximadamente 7), en medio modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco) inmediatamente antes de uso. La concentración final de las células en el hidrogel de péptidos de auto-ensamblaje fue 1×10^6 células/100 microlitros.

MATERIAL DE PRUEBA (N=4|condición)

1. No tejido de VICRYL + 1×10^6 células derivadas del cordón umbilical
2. Espuma 35/65 de PCL/PGA + 1×10^6 células derivadas del cordón umbilical
3. Péptido de auto-ensamblaje RAD16 + 1×10^6 células derivadas del cordón umbilical
4. Espuma 35/65 de PCL/PGA
5. No tejido de VICRYL

Preparación de animales. Los animales utilizados en este estudio se manipularon y mantuvieron según los actuales requisitos del Acta de Bienestar Animal. El cumplimiento de las leyes públicas anteriores se llevó a cabo adhiriéndose a las reglamentaciones de Bienestar Animal (9 CFR) y conforme a las actuales normas promulgadas en la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7ª edición.

Animales: Se usaron ratones macho (*Mus musculus*) (Fox Chase SCID; Harlan Sprague Dawley, Inc., Indianápolis, Indiana) a las 5 semanas de edad. Toda la manipulación de los ratones SCID tuvo lugar bajo una campana. Cada animal se pesó individualmente y se anestesió con una inyección intraperitoneal de una mezcla de 60 miligramos/kilogramo de KETASET (clorhidrato de ketamina) (Aveco Co., Inc., Fort Dodge, Iowa), 10 miligramos/kilogramo de ROMPUN (xilazina) (Mebay Corp., Shawnee, Kansas) y solución salina. Después de la inducción de anestesia, el lomo del animal desde el área cervical dorsal hasta el área lumbosacra dorsal se cortó sin pelo usando tijeras para animales eléctricas. Entonces, el área se lavó con diacetato de clorhexidina, se aclaró con alcohol, se secó y se pintó con una disolución de yodóforo acuosa de 1 % de yodo disponible. Se aplicó pomada oftálmica a los ojos para prevenir el secado del tejido durante el periodo anestésico.

Técnica de implantación subcutánea. Se hicieron cuatro incisiones en la piel, cada una de aproximadamente 1 centímetro de longitud, sobre la espalda de los ratones. Se localizaron dos sitios de implantación craneal, con uno a la izquierda y uno a la derecha de la columna vertebral, transversalmente sobre la región torácica lateral dorsal, aproximadamente 5 milímetros caudal al borde inferior palpado del omóplato. Se colocaron dos implantes adicionales, uno en cada lado de la línea media, transversalmente sobre el área del músculo glúteo al nivel sacro-lumbar caudal, aproximadamente 5 milímetros caudal a la cresta ilíaca palpada. Los implantes se colocaron aleatoriamente en estos sitios. La piel se separó del tejido conjuntivo subyacente para hacer un pequeño bolsillo y se colocó el implante (o se inyectó en el caso del péptido de auto-ensamblaje) aproximadamente 1 centímetro caudal a la incisión. El material de prueba apropiado se implantó en el espacio subcutáneo. La incisión en la piel se cerró con grapas metálicas.

Alojamiento de animales. Los animales se alojaron individualmente en jaulas Microisolator durante todo el transcurso del estudio dentro de un intervalo de temperatura de 64°F – 79°F y humedad relativa del 30 % al 70 %, y se mantuvieron en un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad (aproximadamente). La dieta consistió en Irradiated Pico Mouse Chow 5058 (Purina Co.) y se proporcionó agua a voluntad.

Los ratones se sacrificaron por inhalación con dióxido de carbono. Se cortaron los implantes subcutáneos con la piel cubriente y se congelaron para histología.

Histología. La piel cortada con implante se fijó con 10 % de formalina tamponada neutra (Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI). Muestras con tejido cubriente y adyacente se cortaron en dos centralmente, se procesaron en parafina y se incorporaron sobre la superficie cortada usando métodos rutinarios. Se seccionó tejido incorporado (secciones de cinco micrómetros) en un micrótopo y se tiñó con hematoxilina y eosina (Poly Scientific, Bay Shore, NY) usando métodos rutinarios.

Resultados

Hubo un mínimo crecimiento hacia adentro de tejido en espumas de control sin las células derivadas del cordón umbilical implantadas subcutáneamente en ratones SCID después de 30 días. A diferencia, hubo un amplio relleno de tejido en espumas implantadas con las células derivadas del cordón umbilical.

Hubo algo de crecimiento hacia adentro de tejido en andamiajes de no tejido VICRYL. Los andamiajes de no tejido sembrados con células derivadas del cordón umbilical mostraron elevada deposición de matriz y vasos sanguíneos maduros.

Resumen. Se mostró que las células derivadas del cordón umbilical humano aumentaron espectacularmente la formación de tejido de buena calidad en andamiajes biodegradables. Se sembraron andamiajes de no tejido absorbibles sintéticos, discos de espuma (5,0 milímetros de diámetro x 1,0 milímetros de espesor) o hidrogeles de péptidos de auto-ensamblaje con células derivadas de cordón umbilical humano y se implantaron subcutáneamente bilateralmente en la región espinal dorsal de ratones SCID. Las células derivadas del cordón umbilical potenciaron el crecimiento hacia adentro de tejido y la formación de vasos sanguíneos sobre los andamiajes en ratones inmunodeficientes, en comparación con aquellas sobre andamiajes no sembrados con las células derivadas del cordón umbilical.

EJEMPLO 13

Trasplante de células derivadas del cordón umbilical bajo la cápsula renal

Se realiza rutinariamente el trasplante de islotes pancreáticos a la cápsula renal para evaluar las metodologías de trasplante para el tratamiento de diabetes (Refaie et al., 1998). Además de los islotes pancreáticos, otras células pueden diferenciarse en células secretoras de insulina capaces de la homeostasis de la glucosa en sangre. Se evaluó la idoneidad de las células derivadas del cordón umbilical para este fin.

Métodos y materiales

Cultivo celular. Se sacaron células derivadas del cordón umbilical (aislado 1, P10) de almacenamiento de nitrógeno

líquido y se cultivaron en medio de crecimiento en matraces T225 recubiertos de gelatina (Sigma) (Corning, Corning, NY) hasta confluencia.

5 El medio de cultivo en las células derivadas del cordón umbilical se sustituyó con medio Ham's F12 (Gibco) que contenía nicotinamida 10 milimolar (Sigma), glucosa 25 milimolar (Sigma), 10 nanogramos/mililitro de EGF (PeproTech, Rocky Hill, NJ), 20 nanogramos/mililitro de bFGF (PeproTech) y GLP-1 15 milimolar (Sigma) y las células se cultivaron adicionalmente durante 2 semanas.

10 Las células de dos matraces se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS), y se obtuvo una suspensión de células individuales usando tripsina/EDTA (Gibco). Se compraron células CD34+ movilizadas por GM-CSF de Cambrex, Walkersville, MD (lote 1F0174 donante 7956). Las células CD34+ se descongelaron y se lavaron en medio DMEM.

15 La suspensión de células se lavó dos veces en DMEM. El número de células y la viabilidad se estimó después de la tinción con azul de tripano (Sigma) usando un hemocitómetro. Se centrifugaron alícuotas de la suspensión de células que contenían ~300.000 células viables a 150 x g y las células se resuspendieron en aproximadamente 6 microlitros de DMEM y se sacaron en una punta de pipeta de 20 microlitros conectada a una jeringa de 1 mililitro. La punta de la pipeta que contenía las células se pinzó usando un pequeño Ligaclip (Ethicon Endosurgery, Cincinnati OH).

20 **Preparación de animales.** Los ratones (*Mus musculus*)/Fox Chase SCID/macho (Harlan Sprague Dawley, Inc., Indianápolis, Indiana) tuvieron 8 semanas de edad. Toda la manipulación de los ratones SCID tuvo lugar bajo una campana. Los ratones se pesaron individualmente y se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de una mezcla de 60 miligramos/kilogramo de KETASET (clorhidrato de ketamina, Aveco Co., Inc., Fort Dodge, Iowa) y 10 miligramos/kilogramo de ROMPUN (xilazina, Mobay Corp., Shawnee, Kansas) y solución salina. Después de la inducción de anestesia, el lomo entero del animal desde el área cervical dorsal hasta el área lumbosacra dorsal se cortó sin pelo usando tijeras para animales eléctricas. El área se lavó con diacetato de clorhexidina, se aclaró con alcohol, se secó y se pintó con una disolución de yodóforo acuosa de 1 % de yodo disponible. Se aplicó pomada oftálmica a los ojos para prevenir el secado del tejido durante el periodo anestésico. El animal anestesiado y quirúrgicamente preparado se colocó en la posición decúbito deseada. Se hizo una incisión transversal en el lado abdominal izquierdo aproximadamente 2 centímetros caudal a la jaula torácica del animal. El riñón se expuso y la cápsula se perforó con una aguja de calibre 26. Se usó una lanceta para la cápsula (punta de la pipeta de vidrio modificada) para crear un espacio por debajo de la cápsula renal en el que se introdujeron las células. Las células se inyectaron mediante una jeringa con una punta de micropipeta unida. Se cerró el bolsillo pasando una pluma de cauterio oftálmica (Aaron Medical Industries, St. Petersburg, Florida) sobre la abertura (no tocar el riñón). El riñón se colocó de nuevo en la posición anatómica correcta, y la capa de músculo se cerró con sutura. La piel se cerró con grapas para heridas.

40 El diseño experimental comprendió un trasplante de células en cada ratón; cuatro tratamientos con valor n de 4 por tratamiento; y tres momentos de tiempo (1, 14 y 30 días).

Los ratones se sacrificaron por inhalación de dióxido de carbono en sus intervalos diseñados. Se escindieron los sitios de implantación renal y se congelaron para histología.

45 **Inmunohistoquímica.** Se incorporaron sitios de implantación renal congelados sobre el borde en compuesto O.C.T. (Sakura Inc., Torrance, CA). El tejido renal se cortó crioseccionando para dar una sección de cinco micrómetros del sitio de implantación y tejido adyacente. Las secciones dadas se fijaron en 4 % de paraformaldehído recientemente preparado (EM Sciences Gibbstown, NJ) en solución salina tamponada con fosfato (Gibco) durante 15 minutos. Las secciones se lavaron en PBS y se incubaron en 3 % de suero de cabra en disolución de bloqueo PBS durante una hora. La disolución de bloqueo se eliminó por aspiración suave. Las secciones se incubaron en anticuerpo anti-núcleos humanos (Chemicon International, Temecula, CA) diluidos 1:100 en disolución de bloqueo durante una hora. Las secciones se lavaron con PBS y se incubaron en anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón marcado fluorescente (Molecular Probes, Eugene, OR), diluido 1:200 en disolución de bloqueo durante 30 minutos en ausencia de luz. Las secciones se lavaron en PBS y se incubaron en DAPI 10 micromolar (Molecular Probes) durante cinco minutos. Las secciones se lavaron en PBS y se examinaron por microscopía fluorescente.

60 **Tinción tricrómica.** Se incorporaron sitios de implantación renal congelados sobre el borde en compuesto O.C.T. (Sakura Inc.). El tejido renal se cortó crioseccionando para dar una sección de cinco micrómetros del sitio de implantación y tejido adyacente. Las secciones dadas se fijaron en formalina tamponada neutra al 10 % (Richard-Allan Scientific) durante 15 minutos. Las secciones se tiñeron con tri-cromo (Poly Scientific) usando métodos del fabricante.

Tratamientos:

- 65
1. 3×10^3 células de cordón umbilical
 2. 3×10^3 células de cordón umbilical + 3×10^3 células CD34⁺

Se añadieron tres animales como control (sin células)

Resultados

La viabilidad de las células derivadas del cordón umbilical fue ~75 %; la de las células CD34⁺ fue del 95 %. Intentos iniciales por trasplantar 1×10^6 células viables fueron insatisfactorios debido a que la cápsula renal no era lo suficientemente grande para acomodar las células. Las células se trasplantaron en el plazo de 3 horas desde la tripsinización. La localización de células posparto bajo la cápsula renal se observó microscópicamente. No hubo diferencias evidentes en el número y distribución de las células derivadas del cordón umbilical con o sin células CD34⁺ en cada momento de tiempo. Hubo una disminución evidente en los números de células con el tiempo.

La tinción de células bajo la cápsula renal mostró la retención de células trasplantadas. Las células humanas se detectaron usando el antígeno nuclear humano. Todas las células (humanas y de ratón) se detectaron usando DAPI.

Las células derivadas del cordón umbilical se observaron microscópicamente 14 y 30 días después del trasplante. Las células humanas se tiñeron de nuevo para el antígeno nuclear humano. Se usó tinción tricrómica para detectar la presencia de colágeno

Resumen. El trasplante de células en la cápsula renal fue satisfactorio. La reducción observada en el número de células con el tiempo en este experimento puede ser debida a varios factores tales como la viabilidad de células en el momento del trasplante, inmunidad innata y disponibilidad insuficiente de nutrientes debido a cuestiones de vascularización. Mientras que la supervivencia a largo plazo o incluso el crecimiento de las células *in vivo* podría ser útil para ciertos fines, no se requiere que las células se usen en muchas aplicaciones, ni estos resultados reflejan la capacidad de las células para sobrevivir y crecer durante largos periodos.

Referencia

Refaie A., Gabr M. et al., (1998) Experimental islet cell transplantation in rats: Optimization of the transplantation site. Trans. Proc. 30:400-403

EJEMPLO 14

Diferenciación neural a corto plazo de células derivadas del cordón umbilical

Se examinó la capacidad de las células posparto derivadas del cordón umbilical (PPDC) para diferenciarse en células de linaje neural.

Materiales y métodos

Aislamiento y expansión de células. Se aislaron PPDC derivadas del cordón umbilical y se expandieron como se describe en el Ejemplo 1 y 2.

Protocolo de Woodbury-Black modificado.

(A) Este ensayo se adaptó de un ensayo originalmente realizado para probar el potencial de inducción neural de células del estroma de la médula ósea (1). Se descongelaron PPDC del cordón umbilical (P4) y el cultivo se expandió en medio de crecimiento a 5.000 células/cm² hasta que se alcanzó la sub-confluencia (75 %). A continuación, las células se tripsinaron y se sembraron a 6.000 células por pocillo de un portaobjeto de vidrio Titretek II (VWR International, Bristol, CT). Como controles también se sembraron citoblastos mesenquimatosos (P3; 1F2155; Cambrex, Walkersville, MD), osteoblastos (P5; CC2538; Cambrex), células del omento (P6), células derivadas de adiposas (documento US6555374 B1) (P6) y fibroblastos dérmicos humanos neonatales (P6; CC2509; Cambrex) bajo las mismas condiciones.

Todas las células se expandieron inicialmente durante 4 días en medio DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contenía 15 % (v/v) de suero bovino fetal (FBS; Hyclone, Logan, UT), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF; 20 nanogramos/mililitro; Peprotech, Rocky Hill, NJ), factor de crecimiento epidérmico (EGF; 20 nanogramos/mililitro; Peprotech), penicilina (50 unidades/mililitro) y estreptomycin (50 microgramos/mililitro (Invitrogen). Después de 4 días, las células se aclararon en solución salina tamponada con fosfato (PBS; Invitrogen) y posteriormente se cultivaron en medio DMEM/F12 + 20 % (v/v) de FBS + penicilina (50 unidades/mililitro) + estreptomycin (50 microgramos/mililitro (Invitrogen) durante 24 horas. Después de 24 horas, las células se aclararon con PBS. A continuación, las células se cultivaron durante 1-6 horas en un medio de inducción que comprendía DMEM/F12 (libre de suero) que contenía hidroxianisol butilado 200 milimolar, cloruro de potasio 10 micromolar, 5 miligramos/mililitro de insulina, forskolina 10 micromolar, ácido valproico 4 micromolar e hidrocortisona 2 micromolar (todos los productos químicos de Sigma, St. Louis, MO). A continuación, las células se fijaron en metanol frío (-20 °C) al 100 % y se realizó inmunocitoquímica (véanse los métodos más adelante) para evaluar la expresión de proteínas nestina humanas.

(B) Se descongelaron PPDC (cordón umbilical, P11) y fibroblastos dérmicos humanos adultos (1F1853, P11) y el cultivo se expandió en medio de crecimiento a 5.000 células/cm² hasta que se alcanzó la sub-confluencia (75 %). A continuación, las células se tripsinaron y se sembraron a densidad similar como en (A), pero sobre (1) placas de 24 pocillos tratadas con cultivo de tejido (TCP, Falcon brand, VWR International), (2) pocillos de TCP + 2 % (peso/volumen) de gelatina adsorbida durante 1 hora a temperatura ambiente, o (3) pocillos de TCP + 20 microgramos/mililitro de laminina de ratón adsorbida (adsorbida durante un mínimo de 2 horas a 37 °C; Invitrogen).

Como en (A) anteriormente, las células se expandieron inicialmente y el medio se cambió en los momentos de tiempo anteriormente mencionados. Se fijó un conjunto de cultivos 5 días y seis horas con 4 % (peso/volumen) de paraformaldehído frío (4 °C) (Sigma) durante 10 minutos a temperatura ambiente. En el segundo conjunto de cultivos, el medio se eliminó y se cambió a medio de expansión de progenitores neurales (NPE) que consistía en medio Neurobasal-A (Invitrogen) que contenía B27 (enriquecimiento con B27; Invitrogen), L-glutamina (4 milimolar), penicilina (50 unidades/mililitro) y estreptomicina (50 microgramos/mililitro (Invitrogen). El medio NPE se enriqueció adicionalmente con ácido retinoico (RA; 1 micromolar; Sigma). Este medio se eliminó 4 días después y los cultivos se fijaron con 4 % (peso/volumen) de paraformaldehído frío (4 °C) (Sigma) durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se tiñeron para la expresión de las proteínas nestina, GFAP y TuJ1 (véase la Tabla 14-1).

Tabla 14-1. Resumen de anticuerpos primarios usados

Anticuerpo	Concentración	Vendedor
Rata 401 (nestin)	1:200	Chemicon, Temecula, CA
Nestin Humana	1:100	Chemicon
TuJ1 (BIII Tubulin)	1:500	Sigma, St. Louis, MO
GFAP	1:2000	DakoCytomation, Carpinteria, CA
Tirosina hidroxilasa (TH)	1:1000	Chemicon
GABA	1:400	Chemicon
Desmin (ratón)	1:300	Chemicon
Alfa actina de músculo liso	1:400	Sigma
Proteína Nuclear Humana (hNuc)	1:150	Chemicon

Protocolo de diferenciación de dos etapas. Se descongelaron PPDC derivadas del cordón umbilical (P11), fibroblastos dérmicos humanos adultos (P11; 1F1853; Cambrex) y el cultivo se expandió en medio de crecimiento a 5.000 células/cm² hasta que se alcanzó la sub-confluencia (75 %). A continuación, las células se tripsinaron y se sembraron a 2.000 células/cm², pero sobre placas de 24 pocillos recubiertas con laminina (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) en presencia de medio NPE enriquecido con bFGF (20 nanogramos/mililitro; Peprotech, Rocky Hill, NJ) y EGF (20 nanogramos/mililitro; Peprotech) (composición de medio completo adicionalmente denominada NPE + F + E). Al mismo tiempo, los progenitores neurales de rata adulta aislados del hipocampo (P4; (062603)) también se sembraron sobre placas de 24 pocillos recubiertas de laminina en medio NPE + F + E. Todos los cultivos se mantuvieron en tales condiciones durante un periodo de 6 días (las células se alimentaron una vez durante ese tiempo), momento en el que el medio se cambió a las condiciones de diferenciación enumeradas en la Tabla 14-2 durante un periodo adicional de 7 días. Los cultivos se fijaron con 4 % (peso/volumen) de paraformaldehído frío en hielo (4 °C) (Sigma) durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se tiñeron para la expresión de las proteínas nestina humana o de rata, GFAP y TuJ1.

Tabla 14-2. Resumen de condiciones para el protocolo de diferenciación de dos etapas

A		B
COND. #	PRE-DIFERENCIACIÓN	2ª ETAPA DIF.
1	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	NPE + SHH (200 ng/ml) + F8 (100 ng/ml)
2	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	NPE + SHH (200 ng/ml) + F8 (100 ng/ml) + RA (1 micromolar)
3	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	NPE + RA (1 micromolar)
4	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)
5	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	Crecimiento Medio
6	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	Condición 1B + rhGDF-5 (20 ng/ml)
7	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	Condición 1B + BMP7 (20 ng/ml)
8	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	Condición 1B + GDNF (20 ng/ml)
9	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	Condición 2B + rhGDF-5 (20 ng/ml)
10	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	Condición 2B + BMP7 (20 ng/ml)
11	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	Condición 2B + GDNF (20 ng/ml)
12	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	Condición 3B + rhGDF-5 (20 ng/ml)
13	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	Condición 3B + BMP7 (20 ng/ml)
14	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	Condición 3B + GDNF (20 ng/ml)
15	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	NPE + rhGDF-5 (20 ng/ml)
16	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	NPE + BMP7 (20 ng/ml)
17	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	NPE + GDNF (20 ng/ml)

Protocolo de inducción de múltiples factores de crecimiento. Se descongelaron PPDC derivadas del cordón umbilical (P11) y el cultivo se expandió en medio de crecimiento a 5.000 células/cm² hasta que se alcanzó la sub-confluencia (75 %). A continuación, las células se tripsinaron y se sembraron a 2.000 células/cm², sobre placas de 24 pocillos recubiertas de laminina (BD Biosciences) en presencia de NPE + F (20 nanogramos/mililitro) + E (20 nanogramos/mililitro). Además, algunos pocillos contuvieron NPE + F + E + 2 % de FBS o 10 % de FBS. Después de cuatro días de condiciones de "pre-diferenciación", se extrajeron todos los medios y las muestras se cambiaron a medio NPE enriquecido con erizo sónico (SHH; 200 nanogramos/mililitro; Sigma, St. Louis, MO), FGF8 (100 nanogramos/mililitro; Peprotech), BDNF (40 nanogramos/mililitro; Sigma), GDNF (20 nanogramos/mililitro; Sigma) y ácido retinoico (1 micromolar; Sigma). Siete días después del cambio de medio, los cultivos se fijaron con 4 % (peso/volumen) de paraformaldehído frío en hielo (4 °C) (Sigma) durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se tiñeron para la expresión de nestina humana, GFAP, TuJ1, desmina y alfa-actina de músculo liso.

Protocolo de co-cultivo de progenitores neurales. Se sembraron progenitores hipocámpicos de rata adulta (062603) como neuroesferas o células individuales (10.000 células/pocillo) sobre placas de 24 pocillos recubiertas de laminina (BD Biosciences) en NPE + F (20 nanogramos/mililitro) + E (20 nanogramos/mililitro).

Se descongelaron las PPDC derivadas del cordón umbilical (P11) y el cultivo se expandió en NPE + F (20 nanogramos/mililitro) + E (20 nanogramos/mililitro) a 5.000 células/cm² durante un periodo de 48 horas. A continuación, las células se tripsinaron y se sembraron a 2.500 células/pocillo sobre cultivos existentes de progenitores neurales. El medio existente se intercambió por medio fresco. Cuatro días después, los cultivos se fijaron con 4 % (peso/volumen) de paraformaldehído frío en hielo (4 °C) (Sigma) durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se tiñeron para proteína nuclear humana (hNuc, Chemicon) (Tabla 14-1 anteriormente) para identificar PPDC.

Inmunocitoquímica. Se realizó inmunocitoquímica usando los anticuerpos enumerados en la Tabla 14-1. Los cultivos se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una disolución de bloqueo de proteína que contenía PBS, 4 % (v/v) de suero de cabra (Chemicon, Temecula, CA) y 0,3 % (v/v) de Triton (Triton X-100; Sigma) durante 30 minutos para acceder a los antígenos intracelulares. Los anticuerpos primarios, diluidos en disolución de bloqueo, se aplicaron a continuación a los cultivos durante un periodo de 1 hora a temperatura ambiente. Se eliminaron las disoluciones de anticuerpo primario y los cultivos se lavaron con PBS antes de la aplicación de disoluciones de anticuerpo secundario (1 hora a temperatura ambiente) que contenían disolución de

bloqueo junto con cabra anti-IgG de ratón-Texas Red (1:250; Molecular Probes, Eugene, OR) y cabra anti-IgG de conejo-Alexa 488 (1:250; Molecular Probes). A continuación, los cultivos se lavaron y se aplicó DAPI 10 micromolar (Molecular Probes) durante 10 minutos para ayudar a visualizar los núcleos celulares.

5 Tras la inmunotinción, la fluorescencia se visualizó usando el filtro de fluorescencia apropiado sobre un microscopio epi-fluorescente invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). La tinción positiva representó la señal de fluorescencia por encima de la tinción de control en la que el procedimiento entero expuesto brevemente anteriormente se siguió, con la excepción de la aplicación de una disolución de anticuerpo primario. Se capturaron imágenes representativas usando una cámara de vídeo en color digital y el software ImagePro (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para
10 muestras teñidas triplemente, cada imagen se tomó usando solo un filtro de emisión cada vez. A continuación se prepararon montajes en capas usando el software Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA).

Resultados

15 **Protocolo de Woodbury-Black.**

(A) Tras la incubación en esta composición de inducción neural, todos los tipos de células se transformaron en células con morfologías bipolares y procesos extendidos. También se observaron otras morfologías no bipolares más grandes. Además, las poblaciones de células inducidas se tiñeron positivamente para nestina, un marcador de citoblastos y células progenitoras neurales multipotentes.
20

(B) Cuando se repitió en placas de plástico de cultivo de tejido (TCP), no se observó expresión de nestina, a menos que la laminina se pre-adsorbiera a la superficie de cultivo. Para evaluar adicionalmente si las células que expresan nestina podrían entonces continuar generando neuronas maduras, se expusieron PPDC y fibroblastos a NPE + RA (1 micromolar), una composición de medio conocida por inducir la diferenciación de
25 citoblastos y células progenitoras neurales en tales células (2, 3, 4). Las células se tiñeron para TuJ1, un marcador para neuronas inmaduras y maduras, GFAP, un marcador de astrocitos, y nestina, un marcador indicativo de progenitores neurales. No se activó la expresión de TuJ1, ni se observaron células con morfología neuronal bajo ninguna de las condiciones probadas, sugiriendo que no se generaron neuronas a corto plazo. Además, no se produjo la expresión de nestina y de GFAP, que se encontraron en PPDC y fibroblastos sobre
30 sustratos recubiertos de laminina, bajo estas condiciones.

Resultados de la diferenciación de dos etapas. Se sembraron aislados de células derivadas del cordón umbilical, además de fibroblastos humanos y progenitores neurales de roedor (como tipos de células de control negativo y positivo, respectivamente) sobre placas recubiertas con (el promotor neural) laminina y se expusieron a 13
35 condiciones de crecimiento diferentes (y dos condiciones de control) conocidas por promover la diferenciación de progenitores neurales en neuronas y astrocitos. Además, se añadieron dos condiciones para examinar la influencia de GDF5 y BMP7 sobre la diferenciación de PPDC. Generalmente, se realizó un enfoque de diferenciación de dos etapas, en el que las células se dispusieron primero en condiciones de expansión de progenitores neurales durante un periodo de 6 días, seguido de condiciones de diferenciación completas durante 7 días. Morfológicamente, las
40 células umbilicales presentaron cambios fundamentales en la morfología de la célula durante todo el transcurso de tiempo de este procedimiento. Sin embargo, en ningún caso se observaron células neuronales o con forma astrocítica, excepto en condiciones en placa de progenitores neurales de control. La inmunocitoquímica, negativa para nestina humana, TuJ1 y GFAP confirmó estas observaciones morfológicas. Los resultados se resumen en la Tabla 14-3 a continuación.
45

50

55

60

65

Tabla 14-3. Resultados de la tinción para nestina humana, GFAP y TuJ1, respectivamente en el experimento de diferenciación de dos etapas. Obsérvese que + significa que al menos una porción (> 0 %) de las células fueron positivas para la tinción indicada. Nestina humana: citoblastos y células progenitoras neurales inmaduros; GFAP: astrocitos; TuJ1: neuronas inmaduras y maduras.

5

CONDICIÓN	Fibroblastos	Umbilical PPDCs	Progenitores Neurales
1	-/-	-/-	+/+/+
2	-/-	-/-	+/+/+
3	-/-	-/-	+/+/+
4	-/-	-/-	+/+/+
5	-/-	-/-	+/+/+
6	-/-	-/-	+/+/+
7	-/-	-/-	+/+/+
8	-/-	-/-	+/+/+
9	-/-	-/-	+/+/+
10	-/-	-/-	+/+/+
11	-/-	-/-	+/+/+
12	-/-	-/-	+/+/+
13	-/-	-/-	+/+/+
14	-/-	-/-	+/+/+
15	-/-	-/-	+/+/+
16	-/-	-/-	+/+/+
17	-/-	-/-	+/+/+

Resultados de la inducción de múltiples factores de crecimiento. Tras una exposición de una semana a una variedad de agentes de diferenciación neural, las células se tiñeron para marcadores indicativos de progenitores neurales (nestina humana), neuronas (TuJ1) y astrocitos (GFAP). Las células cultivadas en la primera etapa en medio que no contenía suero tuvieron morfologías diferentes de aquellas células en medio que contenía suero (2 % o 10 %), que indica posible diferenciación neural. Específicamente, tras un procedimiento de dos etapas de exposición de PPDC umbilicales a EGF y bFGF, seguido de SHH, FGF8, GDNF, BDNF y ácido retinoico, las células mostraron procesos extendidos largos similares a las morfología de astrocitos cultivados. Cuando se incluyeron 2 % de FBS o 10 % de FBS en la primera etapa de diferenciación, aumentó el número de células y la morfología de la célula no cambió de cultivos de control a alta densidad. La posible diferenciación neural no se demostró por análisis inmunocitoquímico para nestina humana, TuJ1 o GFAP.

Procedimientos de co-cultivo de progenitores neurales y PPDC. Se sembraron células derivadas del cordón umbilical sobre cultivos de progenitores neurales de rata dos días antes en condiciones de expansión neural (NPE + F + E). Aunque la confirmación visual del cordón umbilical en placa demostró que estas células se sembraron como células individuales, la tinción nuclear específica de ser humano (hNuc) 4 días después de la siembra (duración total del experimento de 6 días) mostró que tendieron a formar una pelota y evitar el contacto con los progenitores neurales. Además, si las células del cordón umbilical se unieron, estas células se extendieron y pareció que estaban invadidas por neuronas diferenciadas que fueron de origen de rata, sugiriendo que las células umbilicales pueden haberse diferenciado en células de músculo. Esta observación se basó en la morfología bajo microscopía de contraste de fases. Otra observación fue que cuerpos de células normalmente grandes (más grandes que los progenitores neurales) poseyeron morfologías que se parecieron a los progenitores neurales, con procesos delgados que abarcaban múltiples direcciones. La tinción con hNuc (encontrada en la mitad del núcleo de la célula) sugirió que en algunos casos estas células humanas pueden haberse fusionado con progenitores de rata y asumido su fenotipo. Los pocillos de control que contenían progenitores neurales solo tuvieron menos progenitores totales y células diferenciadas evidentes que los pocillos de co-cultivo que contenían cordón umbilical, que indica adicionalmente que las células derivadas del cordón umbilical influyeron en la diferenciación y comportamiento de progenitores neurales tanto por la liberación de quimiocinas y citocinas, como por efectos mediados por el contacto.

Resumen. Se realizaron múltiples protocolos para determinar el potencial a corto plazo de las PPDC derivadas del cordón umbilical de diferenciarse en células de linaje neural. Éstos incluyeron obtención de imágenes por contraste de fases de morfología en combinación con inmunocitoquímica para nestina, TuJ1 y GFAP, proteínas asociadas a citoblastos y células progenitoras neurales multipotentes, neuronas inmaduras y maduras, y astrocitos, respectivamente. Se observó evidencia que sugería que la diferenciación neural se produjo en ciertos casos en estos protocolos a corto plazo.

Se hicieron varias observaciones notables en co-cultivos de PPDC con progenitores neurales. Este enfoque, usando PPDC humanas junto con un tipo xenógeno de célula, permitió la determinación absoluta del origen de cada célula en estos cultivos. Primero, se observaron algunas células en estos cultivos en los que el citoplasma de la célula estaba agrandado, con procesos similares a axón que se extendían desde el cuerpo de la célula, incluso solo la mitad del cuerpo marcado con proteína hNuc. Aquellas células pueden ser PPDC humanas que se han diferenciado en células de linaje neural o pueden ser PPDC que se han fusionado con progenitores neurales de origen de rata. Segundo, pareció que los progenitores neurales extendieron axones a PPDC en una forma que indica que los progenitores se diferenciaron en neuronas e inervaron las PPDC. Tercero, los cultivos de progenitores neurales y PPDC tuvieron más células de origen de rata y cantidades mayores de diferenciación que los cultivos de progenitores neurales de control solos, que indica adicionalmente que las PPDC sembradas proporcionaron factores solubles y/o mecanismos dependientes del contacto que estimularon la supervivencia, proliferación y/o diferenciación de progenitores neurales.

Referencias

- (1) Woodbury, D. et al. (2000). J Neurosci. Research. 61(4): 364-70.
- (2) Jang, Y.K. et al. (2004). J. Neurosci. Research. 75(4): 573-84.
- (3) Jones-Villeneuve, E.M. et al. (1983). Mol Cel Biol. 3(12): 2271-9.
- (4) Mayer-Proschel, M. et al. (1997). Neuron. 19(4): 773-85.

EJEMPLO 15

Diferenciación neural a largo plazo de células derivadas del cordón umbilical

Se evaluó la capacidad de las células derivadas del cordón umbilical para someterse a diferenciación a largo plazo en células de linaje neural.

Materiales y métodos

Aislamiento y expansión de células posparto (PPDC). Se aislaron PPDC derivadas del cordón umbilical y se expandieron como se describe en los Ejemplos 1 y 2.

Congelación y siembra de células derivadas del cordón umbilical. Se descongelaron alícuotas congeladas de las células derivadas del cordón umbilical P11 y P12, previamente cultivadas en medio de crecimiento, y se sembraron a 5.000 células / cm² en matraces T-75 recubiertos de laminina (BD, Franklin Lakes, NJ) en medio Neurobasal-A (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contenía B27 (enriquecimiento con B27, Invitrogen), L-glutamina (4 milimolar), penicilina (50 unidades/mililitro) y estreptomycin (50 microgramos/mililitros), cuya combinación se denomina en el presente documento medio de expansión de progenitores neurales (NPE). El medio NPE se enriqueció adicionalmente con bFGF (20 nanogramos/mililitro, Peprotech, Rocky Hill, NJ) y EGF (20 nanogramos/mililitro, Peprotech, Rocky Hill, NJ), en el presente documento denominado NPE + bFGF + EGF.

Siembra de células de control. Además, se descongelaron fibroblastos dérmicos humanos adultos (MP11, Cambrex, Walkersville, MD) y citoblastos mesenquimatosos (P5, Cambrex) y se sembraron a la misma densidad de siembra de células sobre matraces T-75 recubiertos con laminina en NPE + bFGF + EGF. Como otro control, se cultivaron fibroblastos y células umbilicales en medio de crecimiento durante el periodo especificado para todos los cultivos.

Expansión de células. Se sustituyeron los medios de todos los cultivos con medio fresco una vez a la semana y se observaron las células para la expansión. En general, cada cultivo se sometió a pases una vez durante un periodo de un mes debido al crecimiento limitado en NPE + bFGF + EGF.

Inmunocitoquímica. Después de un periodo de un mes, todos los matraces se fijaron con 4 % (peso/volumen) de paraformaldehído frío (4 °C) (Sigma) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se realizó inmunocitoquímica usando anticuerpos dirigidos contra TuJ1 (tubulina BIII; 1:500; Sigma, St. Louis, MO) y GFAP (proteína ácida fibrilar de la glía; 1:2000; DakoCytomation, Carpinteria, CA). Brevemente, los cultivos se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una disolución de bloqueo de proteína que contenía PBS, 4 % (v/v) de suero de cabra (Chemicon, Temecula, CA) y 0,3 % (v/v) de Triton (Triton X-100; Sigma) durante 30 minutos para acceder a los antígenos intracelulares. Los anticuerpos primarios, diluidos en disolución de bloqueo, se aplicaron a continuación a los cultivos durante un periodo de 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se eliminaron las

disoluciones de anticuerpo primario y los cultivos se lavaron con PBS antes de la aplicación de disoluciones de anticuerpo secundario (1 hora a temperatura ambiente) que contenían bloqueo junto con cabra anti-IgG de ratón-Texas Red (1:250; Molecular Probes, Eugene, OR) y cabra anti-IgG de conejo-Alexa 488 (1:250; Molecular Probes). A continuación, los cultivos se lavaron y se aplicó DAPI 10 micromolar (Molecular Probes) durante 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.

Tras la inmunotinción, la fluorescencia se visualizó usando el filtro de fluorescencia apropiado sobre un microscopio epi-fluorescente invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). En todos los casos, la tinción positiva representó la señal de fluorescencia por encima de la tinción de control en la que el procedimiento entero expuesto brevemente anteriormente se siguió, con la excepción de la aplicación de una disolución de anticuerpo primario. Se capturaron imágenes representativas usando una cámara de vídeo en color digital y el software ImagePro (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para muestras teñidas triplemente, cada imagen se tomó usando solo un filtro de emisión cada vez. A continuación se prepararon montajes en capas usando el software Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA).

Resultados

El medio NPE + bFGF + EGF ralentiza la proliferación de PPDC y altera su morfología. Inmediatamente tras la siembra, un subconjunto de células umbilicales se unió a los matraces de cultivo recubiertos con laminina. Esto puede haber sido debido a muerte celular en función del proceso de congelación/descongelación o debido a las nuevas condiciones de crecimiento. Las células que no se unieron adoptaron morfologías diferentes de aquellas observadas en medio de crecimiento.

Tras la confluencia, los cultivos se sometieron a pases y se observaron para el crecimiento. Tuvo lugar muy poca expansión de aquellas células que sobrevivieron a los pases. En este momento empezaron a aparecer células muy pequeñas sin morfología de propagación y con características de brillo de fases en cultivos de células umbilicales. Estas áreas del matraz se siguieron con el tiempo. A partir de estas pequeñas células emergieron procesos de bifurcación con varicosidades a lo largo de sus longitudes, características muy similares a los progenitores neuronales PSA-NCAM+ previamente descritos y neuronas inmaduras TuJ1+ derivadas de cerebro y médula espinal (1, 2). Con el tiempo, estas células fueron más numerosas, sin embargo solo se encontraron en clones.

Clones de células umbilicales expresan proteínas neuronales, pero no de la glía. Se fijaron cultivos un mes después de la congelación/siembra y se tiñeron para la proteína neuronal TuJ1 y GFAP, un filamento intermedio encontrado en astrocitos. Aunque se encontró que todos los cultivos de control cultivados en medio de crecimiento y fibroblastos humanos y las MSC cultivadas en medio NPE + bFGF + EGF eran TuJ1-/GFAP-, las células umbilicales activaron la expresión de TuJ1. La expresión se observó en células con y sin morfologías similares a neuronales. No se observó expresión de GFAP en ningún cultivo. El porcentaje de células que expresan TuJ1 con morfologías similares a neuronales fue inferior a o igual al 1 % de la población total (n = 3 aislados umbilicales probados).

Resumen. Se desarrollaron métodos para generar neuronas diferenciadas (basados en la expresión de TuJ1 Y morfología neuronal) de células umbilicales. Aunque la expresión para TuJ1 no se examinó antes de un mes *in vitro*, es evidente que al menos una pequeña población de las células derivadas del cordón umbilical puede dar lugar a neuronas tanto mediante diferenciación por defecto como mediante inducción a largo plazo tras la exposición de un mes a un medio mínimo enriquecido con L-glutamina, FGF básico y EGF.

Referencia para el Ejemplo 15

- (1) Mayer-Proschel, M. et al. (1997). *Neuron*. 19(4): 773-85.
- (2) Yang, H. et al. (2000). *PNAS*. 97(24): 13366-71.

EJEMPLO 16

Factores tróficos de células derivadas del cordón umbilical para la diferenciación de progenitores neurales

Se examinó la influencia de las células posparto derivadas del cordón umbilical (PPDC) sobre la supervivencia y diferenciación de citoblastos y células progenitoras neurales adultas mediante mecanismos (tróficos) dependientes de no contacto.

Materiales y métodos

Aislamiento de citoblastos y células progenitoras neurales adultas. Se sacrificaron ratas adultas Fisher 344 por asfixia con CO₂, seguido de dislocación cervical. Se extrajeron los cerebros completos intactos usando pinzas de osteotomía de hueso y el tejido del hipocampo se diseccionó basándose en incisiones coronales posteriores a las regiones motoras y somatosensoriales del cerebro (1). Se lavó tejido en medio Neurobasal-A (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contenía B27 (enriquecimiento con B27; Invitrogen), L-glutamina (4 milimolar; Invitrogen) y penicilina (50 unidades/mililitro) y estreptomicina (50 microgramos/mililitro) (Invitrogen), cuya combinación se denomina en el presente documento medio de expansión de progenitores neurales (NPE). El medio NPE se enriqueció

adicionalmente con bFGF (20 nanogramos/mililitro, Peprotech, Rocky Hill, NJ) y EGF (20 nanogramos/mililitro, Peprotech, Rocky Hill, NJ), en el presente documento denominado NPE + bFGF + EGF.

Tras el lavado, las meninges de revestimiento se eliminaron, y el tejido se troceó con un bisturí. Se recogió el tejido troceado y se añadió tripsina/EDTA (Invitrogen) como 75 % del volumen total. También se añadió DNasa (100 microlitros por 8 mililitros de volumen total, Sigma, St. Louis, MO). A continuación, el tejido/medio se sometió secuencialmente a pases a través de una aguja de calibre 18, aguja de calibre 20, y finalmente una aguja de calibre 25 una vez cada una (todas las agujas de Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). La mezcla se centrifugó durante 3 minutos a 250 x g. Se eliminó el sobrenadante, se añadió NPE + bFGF + EGF nuevo y el sedimento se resuspendió. La suspensión de células resultante se pasó a través de un filtro de células de 40 micrómetros (Becton Dickinson), se sembró en matraces T-75 recubiertos de laminina (Becton Dickinson) o placas de 24 pocillos de baja agrupación (Becton Dickinson), y se cultivó en medio NPE + bFGF + EGF hasta que se obtuvieron números suficientes de células para los estudios brevemente expuestos.

Siembra de células PPDC. Se sembraron células derivadas del posparto (P12) previamente cultivadas en medio de crecimiento a 5.000 células / inserto Transwell (dimensionado para la placa de 24 pocillos) y se cultivaron durante un periodo de una semana en medio de crecimiento en insertos para lograr la confluencia.

Siembra de progenitores neurales adultos. Se sembraron progenitores neurales, cultivados como neuroesferas o como células individuales, sobre placas de 24 pocillos recubiertas de laminina a una densidad aproximada de 2.000 células / pocillo en NPE + bFGF + EGF durante un periodo de un día para promover la unión celular. Un día después, los insertos Transwell que contenían las células posparto se añadieron según el siguiente esquema:

- (1) Transwell (cordón umbilical en medio de crecimiento, 200 microlitros) + progenitores neurales (NPE + bFGF + EGF, 1 mililitro)
- (2) Transwell (fibroblastos dérmicos humanos adultos [1F1853; Cambrex, Walkersville, MD] P12 en medio de crecimiento, 200 microlitros) + progenitores neurales (NPE + bFGF + EGF, 1 mililitro)
- (3) Control: progenitores neurales solos (NPE + bFGF + EGF, 1 mililitro)
- (4) Control: progenitores neurales solos (NPE solo, 1 mililitro)

Inmunocitoquímica. Después de 7 días en co-cultivo, todas las condiciones se fijaron con 4 % (peso/volumen) de paraformaldehído frío (Sigma) durante un periodo de 10 minutos a temperatura ambiente. Se realizó inmunocitoquímica usando anticuerpos dirigidos contra los epítopes enumerados en la Tabla 16-1. Brevemente, los cultivos se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una disolución de bloqueo de proteína que contenía PBS, 4 % (v/v) de suero de cabra (Chemicon, Temecula, CA) y 0,3 % (v/v) de Triton (Triton X-100; Sigma) durante 30 minutos para acceder a los antígenos intracelulares. A continuación, se aplicaron los anticuerpos primarios, diluidos en disolución de bloqueo, a los cultivos durante un periodo de 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se eliminaron las disoluciones de anticuerpos primarios y los cultivos se lavaron con PBS antes de la aplicación de disoluciones de anticuerpo secundario (1 hora a temperatura ambiente) que contenían disolución de bloqueo junto con cabra anti-IgG de ratón-Texas Red (1:250; Molecular Probes, Eugene, OR) y cabra anti-IgG de conejo-Alexa 488 (1:250; Molecular Probes). A continuación, los cultivos se lavaron y se aplicó DAPI 10 micromolar (Molecular Probes) durante 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.

Tras la inmunotinción, la fluorescencia se visualizó usando el filtro de fluorescencia apropiado sobre un microscopio epi-fluorescente invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). En todos los casos, la tinción positiva representó la señal de fluorescencia por encima de la tinción de control en la que el procedimiento entero expuesto brevemente anteriormente se siguió, con la excepción de la aplicación de una disolución de anticuerpo primario. Se capturaron imágenes representativas usando una cámara de vídeo en color digital y el software ImagePro (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para muestras teñidas triplemente, cada imagen se tomó usando solo un filtro de emisión cada vez. A continuación se prepararon montajes en capas usando el software Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA).

Tabla 16-1. Resumen de anticuerpos primarios usados

Anticuerpo	Concentración	Vendedor
Rata 401 (nestin)	1:200	Chemicon, Temecula, CA
TuJ1 (BIII Tubulin)	1:500	Sigma, St. Louis, MO
Tyrosine hidroxilasa (TH)	1:1000	Chemicon
GABA	1:400	Chemicon
GFAP	1:2000	DakoCytomation, Carpinteria, CA
Proteína Básica Mielin (MBP)	1:400	Chemicon

Análisis cuantitativo de la diferenciación de progenitores neurales. Se examinó la diferenciación de progenitores neurales hipocámpicos y se cuantificó. Se contó un mínimo de 1.000 células por condición, o si hay menos, el número total de células observadas en esa condición. El porcentaje de células positivas para una tinción dada se evaluó dividiendo el número de células positivas entre el número total de células como se ha determinado por tinción con DAPI (nuclear).

Análisis de espectrometría de masas y electroforesis en gel 2D. Con el fin de identificar factores secretados únicos como resultado del co-cultivo, muestras de medio acondicionado tomadas antes de la fijación del cultivo se congelaron a -80 °C durante la noche. Las muestras se aplicaron a continuación a dispositivos de centrifugación por ultrafiltración (corte de MW nominal 30 kD). El concentrado se sometió a cromatografía de inmunoafinidad (anti-albúmina humana; IgY) (la inmunoafinidad no eliminó la albúmina de las muestras). Se analizó el filtrado por MALDI-TOFF. El eluato se aplicó a cromatografía de afinidad Cibachron Blue. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE y electroforesis en gel 2D.

Resultados

El co-cultivo de umbilical estimula la diferenciación de progenitores neurales adultos. Tras el cultivo con las células posparto derivadas del cordón umbilical, las células progenitoras neurales co-cultivadas derivadas de hipocampo de rata adulta presentaron una diferenciación significativa a lo largo de los tres linajes principales en el sistema nervioso central. Este efecto se observó claramente después de cinco días en co-cultivo, elaborando numerosas células procesos complejos y perdiendo sus características de brillo de fases características de las células progenitoras en división. En cambio, los progenitores neurales cultivados solos en ausencia de bFGF y EGF aparecieron enfermos y la supervivencia fue limitada.

Después de completarse el procedimiento, los cultivos se tiñeron para marcadores indicativos de citoblastos y células progenitoras sin diferenciar (nestina), neuronas inmaduras y maduras (TuJ1), astrocitos (GFAP) y oligodendrocitos maduros (MBP). Se confirmó la diferenciación a lo largo de los tres linajes, mientras que las condiciones de control no presentaron diferenciación significativa como se demuestra por la retención de la tinción positiva para nestina entre la mayoría de las células.

Se cuantificó el porcentaje de progenitores neurales diferenciados tras el co-cultivo con PPDC derivadas del cordón umbilical (Tabla 16-2). Las células derivadas del cordón umbilical potenciaron significativamente el número de oligodendrocitos maduros (MBP) (24,0 % frente al 0 % en ambas condiciones de control). Además, el co-cultivo potenció el número de astrocitos GFAP+ y neuronas TuJ1+ en cultivo (47,2 % y 8,7 % respectivamente). Estos resultados se confirmaron por tinción con nestina que indica que el estado de progenitores se perdió tras el co-cultivo (13,4 % frente al 71,4 % en la condición de control 3).

Aunque la diferenciación también pareció influirse por fibroblastos humanos adultos, tales células no fueron capaces de promover la diferenciación de oligodendrocitos maduros ni fueron capaces de generar una cantidad apreciable de neuronas. Aunque no se cuantificaron, pareció, sin embargo, que los fibroblastos potenciaron la supervivencia de progenitores neurales y su progenie similar a hallazgos para las células posparto derivadas del cordón umbilical.

Tabla 16-2. Cuantificación de la diferenciación de progenitores en control frente a co-cultivo en Transwell con las células posparto derivadas del cordón umbilical (E=EGF, F=bFGF).

Anticuerpo	F+E / Umb [Cond.1]	F+E/F+E [Cond. 3]	F+E/removido [Cond.4]
TuJ1	8.7 %	2.3 %	3.6 %
GFAP	47.2 %	30.2 %	10.9 %
MBP	23.0 %	0 %	0 %
Nestin	13.4 %	71.4 %	39.4 %

Identificación de compuestos únicos. Se examinaron medios acondicionados de las condiciones de prueba umbilicales junto con los controles apropiados (medio NPE ± 1,7 % de suero, medio de co-cultivo con fibroblastos) para diferencias. Se identificaron compuestos posiblemente únicos y se cortaron de sus geles 2D respectivos.

Resumen. Los resultados presentados en este ejemplo indican que la diferenciación de células progenitoras neurales adultas tras el co-cultivo con las células posparto derivadas del cordón umbilical es particularmente profunda. Específicamente, se generaron un porcentaje significativo de oligodendrocitos maduros en co-cultivos de células umbilicales. En vista de la ausencia de contacto entre células umbilicales y progenitores neurales, este resultado parece ser una función de factores solubles liberados de las células umbilicales (efecto trófico).

Se hicieron varias otras observaciones. Primera, hubo muy pocas células en la condición de control en la que se eliminaron EGF y bFGF. La mayoría de las células murieron y, en promedio, hubo aproximadamente 100 células o

menos por pocillo. Segundo, cabe esperar que haya muy poca diferenciación en la condición de control en la que se retuvieron EGF y bFGF en todo el medio, ya que éste es normalmente un medio de expansión. Aunque se observó que aproximadamente el 70 % de las células retenían su estado progenitor (nestina+), aproximadamente el 30 % fueron GFAP+ (indicativo de astrocitos). Esto puede ser debido al hecho de que tal expansión significativa se produjo durante todo el transcurso del procedimiento, que el contacto entre progenitores indujo esta diferenciación. Se ha informado de hallazgos similares en la bibliografía (2).

Referencia para el Ejemplo 16

- (1) Paxinos, G. & Watson, C. (1997). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.
 (2) Song, H. et al. (2002). Nature. 417(6884): 29-32.

EJEMPLO 17

El efecto de factores tróficos sobre la angiogénesis

La angiogénesis, o formación de nueva vasculatura, es necesaria para el crecimiento de tejido nuevo. La inducción de la angiogénesis es un objetivo terapéutico importante en muchas afecciones patológicas. Se examinó la actividad angiogénica de las células derivadas del cordón umbilical en ensayos *in vitro*. Se utilizó un método bien establecido de evaluación de la actividad angiogénica que implica la siembra de células endoteliales sobre una placa de cultivo recubierta con un extracto de la membrana basal (Nicosia y Ottinetti (1990) In Vitro Cell Dev. Biol. 26(2): 119-28). El tratar células endoteliales sobre tales membranas basales o matriz extracelular con factores angiogénicos estimulará las células para formar una red que es similar a capilares. Estos tipos de ensayos son ensayos *in vitro* comunes para probar estimulantes e inhibidores de la formación de vasos sanguíneos (Ito et al. (1996) Int. J. Cancer 67(1):148-52). Los protocolos utilizados en este ejemplo hicieron uso de un sistema de co-cultivo con las células derivadas del cordón umbilical sembradas sobre insertos de pocillos de cultivo. Estos insertos permeables permiten el intercambio pasivo de componentes del medio entre los medios de células de cultivo endoteliales y derivadas del cordón umbilical.

Material y métodos

Cultivo celular.

Células derivadas del cordón umbilical. Se recibieron cordones umbilicales humanos y las células se aislaron como se ha descrito previamente (Ejemplo 1). Las células se cultivaron en medio de crecimiento sobre matraces de plástico de cultivo de tejido recubiertos de gelatina. Los cultivos se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂. Las células usadas para experimentos estuvieron entre los pases 4 y 12.

Células UDC activamente en crecimiento se tripsinaron, se contaron y se sembraron sobre insertos de cultivo de tejido de 6,5 milímetros de diámetro (COSTAR TRANSWELL, Corning Inc., Corning, NY) a 15.000 células por inserto. Las células se cultivaron sobre los insertos durante 48-72 horas en medio de crecimiento con 5 % de CO₂ a 37 °C.

Citoblastos mesenquimatosos humanos (hMSC). Se compraron hMSC de Cambrex (Walkersville, MD) y se cultivaron en MSCGM (Cambrex). Los cultivos se incubaron con 5 % de CO₂ a 37 °C.

Se tripsinaron MSC activamente en crecimiento y se contaron y se sembraron sobre insertos de cultivo de tejido de 6,5 milímetros de diámetro (Corning, Corning, NY) a 15.000 células por inserto. Las células se cultivaron sobre los insertos durante 48-72 horas en medio de crecimiento con 5 % de CO₂ a 37 °C.

Células endoteliales de la vena umbilical humanas (HUVEC). Se obtuvieron HUVEC de Cambrex (Walkersville, MD). Las células se cultivaron en cultivos separados en tanto medios de células endoteliales EBM como EGM (Cambrex). Las células se cultivaron sobre plástico cultivado con tejido estándar con 5 % de CO₂ a 37 °C. Las células usadas en el ensayo oscilaron de los pases 4 a 10.

Células endoteliales de la arteria coronaria humanas (HCAEC). Se compraron HCAEC de Cambrex Incorporated (Walkersville, MD). Estas células también se mantuvieron en cultivos separados en tanto las formulaciones de medios EBM como EGM. Las células se cultivaron sobre plástico de tejido cultivado estándar con 5 % de CO₂ a 37 °C. Las células usadas para los experimentos oscilaron de los 4 a 8.

Ensayos de angiogénesis sobre matriz extracelular. Se recubrieron placas de cultivo con material de matriz extracelular según las especificaciones del fabricante. Brevemente, se descongeló el material de matriz extracelular (MATRIGEL, BD Discovery Labware, Bedford, MA) a 4 °C y se distribuyeron aproximadamente 250 microlitros sobre cada pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos enfriada (Corning). A continuación, la placa se incubó a 37 °C durante 30 minutos para permitir que el material solidificara. Se tripsinaron y se contaron cultivos de células endoteliales activamente en crecimiento. Las células se lavaron dos veces en medio de crecimiento con 2 % de FBS

por centrifugación, resuspensión y aspiración del sobrenadante. Las células se sembraron sobre los pocillos recubiertos a 20.000 células por pocillo en aproximadamente 0,5 mililitros de medio de crecimiento enriquecido con 2 % (v/v) de FBS. Entonces, las células se incubaron durante aproximadamente 30 minutos para permitir que las células sedimentaran.

A continuación se trataron cultivos de células endoteliales con tanto bFGF humano 10 nanomolar (Peprotech, Rocky Hill, NJ) como VEGF humano 10 nanomolar (Peprotech, Rocky Hill, NJ) para servir de controles positivos para la respuesta de células endoteliales. Se añadieron insertos Transwell sembrados con células posparto a pocillos apropiados con medio de crecimiento enriquecido con solo 2 % de FBS en la cámara del inserto. Los cultivos se incubaron en 5 % de CO₂ a 37 °C durante aproximadamente 24 horas. La placa de pocillos se sacó de la estufa de incubación, y se recogieron imágenes de los cultivos de células endoteliales con un microscopio invertido Olympus (Olympus, Melville, NY).

Resultados

En un sistema de co-cultivo con células derivadas del cordón umbilical, HUVEC forman redes de células estructuradas. Las células HUVEC forman redes de células limitadas en experimentos de co-cultivo con hMSC y con bFGF 10 nanomolar. Las células HUVEC sin ningún tratamiento mostraron muy poca o ninguna formación de redes. Estos resultados sugieren que las células derivadas del cordón umbilical liberan factores angiogénicos que estimulan las HUVEC. Similarmente, las HCAEC formaron redes de células solo en co-cultivo con células derivadas del cordón umbilical.

La Tabla 17-1 muestra cantidades de factores angiogénicos conocidos liberados por UDC en medio de crecimiento a condiciones de oxígeno atmosférico. Las UDC se sembraron sobre insertos como se ha descrito anteriormente. Las células se cultivaron a 37 °C en oxígeno atmosférico durante 48 horas sobre los insertos y a continuación se cambiaron a 2 % de medio FBS y volvieron a 37 °C durante 24 horas. Se eliminó el medio, se congeló inmediatamente y se guardó a -80 °C, y se analizó por el ensayo de ELISA de múltiplex SearchLight (Pierce Chemical Company, Rockford, IL). Los resultados mostrados son los promedios de mediciones por duplicado. Los resultados muestran que las UDC no liberan niveles detectables de factor de crecimiento derivado de plaquetas-bb (PDGF-bb), factor de crecimiento epidérmico de unión a la heparina (HB-EGF) o factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Las cantidades de angiopoyetina 2 (ANG2) detectadas fueron inferiores a las del control de medio de cultivo sin células. Las células derivadas del cordón umbilical liberaron cantidades medibles de inhibidor de tejido de metaloproteasa-1 (TIMP-1), trombopoyetina (TPO) y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). Las cantidades de factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) fueron muy bajas y solo ligeramente por encima de aquellas para el medio de control.

Tabla 17-1. Posibles factores angiogénicos liberados de UDC. Células derivadas del cordón umbilical se cultivaron 24 horas en medio con 2 % de FBS en oxígeno atmosférico. Se eliminó el medio y se ensayó por el ensayo de ELISA múltiplex SearchLight™ (Pierce). Los resultados son las medias de un análisis por duplicado. Los valores son concentraciones en el medio informados en picogramos por mililitro de medio de cultivo.

	TIMP1 (pg/mL)	ANG2 (pg/mL)	PDGFBB (pg/mL)	TPO (pg/mL)	KGF (pg/mL)	HGF (pg/mL)	FGF (pg/mL)	VEGF (pg/mL)	HBEGF (pg/mL)
UDCs (P4)	81831.7	<9.8	<2.0	365.9	14.1	200.2	5.8	<4.0	<1.2
Solo Media	<9.8	25.1	<2.0	<6.4	<2.0	<3.2	<5.4	<4.0	<1.2

La Tabla 17-2 muestra niveles de factores angiogénicos conocidos liberados por UDC al 5 % de O₂. Las UDC se sembraron sobre insertos como se ha descrito anteriormente. Las células se cultivaron en medio de crecimiento a 5 % de oxígeno durante 48 horas sobre los insertos y a continuación se cambiaron a 2 % de medio FBS y volvieron a incubación con 5 % de O₂ durante 24 horas. Se eliminó el medio, se congeló inmediatamente y se guardó a -80 °C, y se analizó por el ensayo de ELISA múltiplex SearchLight™ (Pierce Chemical Company, Rockford, IL). Los resultados mostrados son los promedios de mediciones por duplicado. Los resultados mostrados para UDC son comparables a aquellos bajo condiciones de oxígeno atmosférico. Aunque esencialmente no hay cambios en la producción de ANG2, PDGFBB, FGF, VEGF y HB-EGF por UDC, hubo un ligero aumento evidente en la producción de TIMP1, KGF y HGF, y una ligera disminución evidente en la producción de TPO. Estas diferencias evidentes en datos sin procesar no se probaron para significación estadística.

Tabla 17-2. Posibles factores angiogénicos liberados de UDC. Células derivadas del posparto se cultivaron 24 horas en medio con 2 % de FBS en 5 % de oxígeno. Se eliminó el medio y se ensayó por el ensayo de ELISA múltiple SearchLight™ (Pierce). Los resultados son las medias de un análisis por duplicado. Los valores son concentraciones en el medio informadas en picogramos por mililitro de medio de cultivo.

	TIMP1 (pg/mL)	ANG2 (pg/mL)	PDGFBB (pg/mL)	TPO (pg/mL)	KGF (pg/mL)	HGF (pg/mL)	FGF (pg/mL)	VEGF (pg/mL)	HBEGF (pg/mL)
UDCs (P4)	50244.7	<9.8	<2.0	403.3	10.7	156.8	5.7	<4.0	<1.2
Solo Media	<9.8	25.1	<2.0	<6.4	<2.0	<3.2	<5.4	<4.0	<1.2

Resumen. Los resultados del estudio muestran que las células derivadas del cordón umbilical pueden estimular tanto células endoteliales de la vena umbilical humana como de la arteria coronaria para formar redes en un ensayo *in vitro* de angiogénesis. Este efecto es similar al observado con factores angiogénicos en tales sistemas de ensayo. Estos resultados sugieren que UDC son útiles para estimular la angiogénesis *in vivo*.

EJEMPLO 18

Diferenciación de células derivadas del cordón umbilical en hepatocitos

Se examinaron una variedad de condiciones para determinar una combinación adecuada de medios básicos y factores de crecimiento para la diferenciación de células derivadas del cordón umbilical en hepatocitos. Se seleccionaron HNF-1alfa, un factor de transcripción específico de hepatocitos, proteínas de los filamentos intermedios citoplásmicos, tales como queratina 19 (K19), queratina 8 (K8) y citoqueratina 18 (CK18), que son marcadores de células epiteliales, y dos proteínas secretadas específicas del hígado, albúmina y citocromo p450 2B6, como marcadores para la diferenciación de hepatocitos (Schwartz et al. (2002) J. Clin. Invest. 109(10):1291-1302; Okumoto et al. (2003) Biochem. Biophys. Res. Commun. 304(4):691-695; Chargracui et al. (2003) Blood 101(8): 2973-2982).

Métodos y materiales

Se cultivaron células derivadas del cordón umbilical obtenidas según el método del Ejemplo 1, además de fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) neonatales o adultos, en medio de crecimiento en matraces T75 recubiertos de gelatina. El factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), oncostatina M, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de citoblastos (SCF) y factor de crecimiento de fibroblastos 4 (FGF 4) fueron de PeproTech Inc. (Rocky Hill, NJ). El factor de crecimiento derivado de plaquetas BB (PDGFbb) fue de R&D Systems (Mineápolis, MN).

Se probaron las siguientes condiciones:

Método 1

Células derivadas del cordón umbilical (P5), fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) neonatales y adultos. Se sembraron células a $22,5 \times 10^3$ células/cm² sobre 1 % de Matrigel (Becton-Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ) en medio sin suero (60 % (v/v) de DMEM-bajo en glucosa) (DMEM-LG; Gibco, Carlsbad, CA), 40 % (v/v) de MCDB-201 (Sigma, St. Louis, MO), enriquecido con 1 × insulina/transferrina/selenio, 4,7 microgramos/mililitro de ácido linoleico, 1 miligramo/mililitro de albúmina de suero bovino, dexametasona 10 nanomolar, fosfato de ácido ascórbico 100 micromolar (todos de Sigma), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomocina (Gibco), 2 % (v/v) de FCS (Hyclon Laboratories, Logan, UT) y 10 nanogramos/mililitro de cada uno de EGF y PDGFbb. Después de 8-12 horas, el medio se eliminó, las células se lavaron dos veces con PBS (Gibco) y se cultivaron en el medio anteriormente descrito sin EGF y PDGFbb, pero enriquecido con 20 nanogramos/mililitro de HGF y/o 10 nanogramos/mililitro de FGF-4 (Schwartz et al. (2002) J. Clin. Invest. 109(10):1291-1302).

Método 2

Células derivadas del cordón umbilical (P5), NHDF neonatales y adultos. Se sembraron células a menor densidad (22.500 células/cm²) en placas de 24 pocillos recubiertas con gelatina y se cultivaron como se ha descrito anteriormente.

Método 3

Células derivadas del cordón umbilical (P17), células derivadas del cordón umbilical (P15), células derivadas del cordón umbilical (P10), NHDF adultos. Se sembraron células a mayor densidad (50.000 células/cm²) en placas TCP

de 24 pocillos y se cultivaron en DMEM (Gibco), enriquecimiento con B27 (Gibco), penicilina (50 unidades/mililitro), estreptomycin (50 microgramos/mililitro), 20 nanogramos/mililitro de HGF y/o 10 nanogramos/mililitro de FGF-4. Las células se cultivaron en estas condiciones durante 4 semanas.

5 Método 4

Células derivadas del cordón umbilical (P4), células derivadas del cordón umbilical (P9), NHDF neonatales y adultos. Se sembraron células a una densidad de 5.000 células/cm² en matraces T25 en medio Chang C (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) sobre tanto fibronectina (PeproTech, Rocky Hill, NJ) como gelatina (Sigma) y se cultivaron durante dos pases hasta la confluencia. A continuación, las células se sembraron a 1.000 células/cm² en placas TCP de 24 pocillos y se cultivaron como se ha descrito anteriormente hasta que alcanzaron aproximadamente el 40-60 % de confluencia.

15 Método 5

Células derivadas del cordón umbilical (P5) y NHDF adultos. Se sembraron células en placas de 24 pocillos sobre gelatina en medio de crecimiento enriquecido con tanto 1 nanogramo/mililitro como 10 nanogramos/mililitro de oncostatina M (Chargraui (2003) Blood 101(8): 2973-2982). Las células se cultivaron en estas condiciones durante 4 semanas.

20 Método 6

Células derivadas del cordón umbilical (P5) y NHDF adultos. Se sembraron células en placas de 24 pocillos sobre gelatina en medio de crecimiento enriquecido con 10 nanogramos/mililitro bFGF, 10 nanogramos/mililitro de HGF, 10 nanogramos/mililitro de SCF. Las células se cultivaron en estas condiciones durante 4 semanas (Okumoto et al. (2003) Biochem. Biophys. Res. Commun. 304(4):691-695.).

Aislamiento de ARN total y RT-PCR cuantitativa. Se extrajo ARN de las células derivadas del cordón umbilical y los fibroblastos se cultivaron como se describe en cada protocolo. Las células se lisaron con 350 microlitros de tampón RLT que contenía beta-mercaptoetanol (Sigma St. Louis, MO) según las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA) y el ARN se extrajo según las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA) con un tratamiento con DNasa de 2,7 unidades/muestra (Sigma). El ARN se eluyó con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se guardó a -80 °C. El ARN se transcribió de forma inversa usando hexámeros al azar con los reactivos de transcripción inversa TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA) a 25 °C durante 10 minutos, 37 °C durante 60 minutos y 95 °C durante 10 minutos. Las muestras se almacenaron a -20 °C.

PCR en tiempo real. Se realizó PCR en muestras de ADNc usando productos de expresión génica ASSAYS-ON-DEMAND para albúmina (Hs00609411), citocromo p450 2B6 (Hs00167937), GAPDH (Applied Biosystems, Foster City, CA) y la mezcla maestra de PCR TaqMan Universal según las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando un sistema de detección de secuencias 7000 con el software ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las condiciones de los ciclos térmicos fueron inicialmente 50 °C durante 2 minutos y 95 °C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto. Los datos de PCR se analizaron según las especificaciones del fabricante (Boletín del usuario nº 2 de Applied Biosystems para el sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700).

Inmunofluorescencia. Se fijaron cultivos celulares con 4 % (peso/volumen) de paraformaldehído frío (4 °C) durante un periodo de 10 minutos a temperatura ambiente. Se realizó inmunocitoquímica usando anticuerpos dirigidos contra los siguientes epítipes: queratina 9 (K9; 1:400; Chemicon, Temecula, CA), queratina 19 (K19; 1:400; Chemicon), citoqueratina 18 (CK18; 1:400; Sigma, St. Louis, MO), vimentina (1:500; Sigma), desmina (1:150; Sigma), albúmina (1:200; Sigma), c-met (1:400; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA) y HNF-1alfa (1:400; Santa Cruz Biotech). En general, los cultivos se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una disolución de bloqueo de proteína que contenía PBS, 4 % (v/v) de suero de cabra (Chemicon, Temecula, CA) y 0,3 % (v/v) de Triton (Triton X-100, Sigma) durante 30 minutos para acceder a los antígenos intracelulares. En los casos en los que el epítipe de interés se localizaría sobre la superficie celular (por ejemplo, c-met), Triton se omitió en todas las etapas del procedimiento con el fin de prevenir la pérdida del epítipe. A continuación, se aplicaron los anticuerpos primarios, diluidos en disolución de bloqueo, a los cultivos durante un periodo de 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se eliminaron las disoluciones de anticuerpo primario y los cultivos se lavaron con PBS antes de la aplicación de disoluciones de anticuerpo secundario (1 hora a temperatura ambiente) que contenían disolución de bloqueo junto con cabra anti-IgG de ratón-Texas Red (1:250; Molecular Probes, Eugene, OR) para K8, K19, CK18, vimentina y albúmina, cabra anti-IgG de conejo-Alexa 488 (1:250; Molecular Probes) para desmina y c-met, o burro anti-IgG de cabra-FITC (1:150; Santa Cruz Biotech) para la tinción de HNF-1alfa. Los cultivos se lavaron y se aplicó DAPI 10 micromolar (Molecular Probes) durante 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.

Tras la inmunotinción, la fluorescencia se visualizó usando el filtro de fluorescencia apropiado sobre un microscopio epi-fluorescente invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). Se capturaron imágenes representativas usando una cámara de vídeo en color digital y el software ImagePro (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para muestras teñidas

triplemente, cada imagen se tomó usando solo un filtro de emisión. A continuación se prepararon montajes en capas usando el software Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA).

Resultados

Con el fin de determinar si las células derivadas del cordón umbilical podrían expresar marcadores epiteliales, las células se cultivaron en medio Chang C. Las células derivadas del cordón umbilical (P2) se cultivaron en medio Chang C durante 11 días. Las células derivadas del cordón umbilical se tiñeron negativas para citoqueratina 18 y queratina 8 por análisis de inmunocitoquímica. Las muestras cultivadas en medio de crecimiento dieron negativo para ambos marcadores.

Se investigó el efecto de efectuar pases, además de sustratos de gelatina y fibronectina. Las células se cultivaron en medio Chang C durante 11 días. Se analizaron la expresión de ARN y proteínas de proteínas epiteliales/específicas de hepatocito. La tinción de inmunocitoquímica para citoqueratina 18, queratina 8, queratina 19, c-met, albúmina, desmina y HNF-1alfa dio negativa en todas las condiciones. Las células se tiñeron positivas para vimentina. La expresión de tanto albúmina como citocromo p450 2B6 a niveles inferiores a los de las células HepG2 humanas se detectó con cebadores de ASSAYS-ON-DEMAND. También se detectó la expresión de albúmina y citocromo p450 2B6 en células cultivadas en medio de crecimiento.

Las células derivadas del cordón umbilical se trataron como se describe en el método 1 según el protocolo desarrollado por Schwartz et al. (2002) J. Clin. Invest. 109(10):1291-1302). Tanto la albúmina como el citocromo p450 2B6 se detectaron con cebadores de ASSAYS-ON-DEMAND a niveles menores que el control positivo HepG2. No emergió ningún patrón claro entre condiciones aplicadas y niveles de expresión génica, es decir, también se detectaron la expresión de cada uno de albúmina y citocromo p450 2B6 en muestras de control. Se detectó algo de expresión de albúmina y citocromo p450 2B6 con cebadores de ASSAYS-ON-DEMAND, sin embargo, los niveles fueron significativamente menores a aquellos observados en células HepG2.

La oncostatina M a baja concentración de 1 nanogramo/mililitro aumentó los niveles de expresión de citocromo p450 2B6 en las células derivadas del cordón umbilical cultivadas en medio de crecimiento sobre matraces recubiertos de gelatina (datos no mostrados). El tratamiento con FGF-4 y HGF tuvo poco efecto y puede haber reducido la expresión de albúmina y citocromo p450 2B6.

Resumen. Se probaron seis protocolos para su capacidad para inducir la diferenciación de las células derivadas del cordón umbilical en fenotipo de hepatocitos. Se detectó la expresión de marcadores específicos de hepatocitos, tales como albúmina y citocromo p450 2B6, que indica así que las células se sometieron a alguna diferenciación en hepatocitos.

EJEMPLO 19

Diferenciación adipogénica de células derivadas del cordón umbilical

Se ha demostrado que poblaciones de citoblastos se diferencian en un fenotipo adipogénico (Janderova et al. (2003) *Obes. Res.* 11(1):65-74; Zangani et al. (1999) *Differentiation* 64(2):91-101; Liu et al. (2003) *Curr. Mol. Med.* 3(4):325-40). Se evaluó el potencial de las células derivadas del cordón umbilical para diferenciarse en un fenotipo adipogénico.

Métodos y materiales

Diferenciación adiposa. Se sembraron células derivadas del cordón umbilical (P4) a 200.000 células por pocillo sobre placas de 6 pocillos tratadas con cultivo de tejido en medio de crecimiento. También se sembraron citoblastos mesenquimatosos (P3, IF2155), osteoblastos (P5, CC2538; Cambrex, Walkerville, MD), células del omento (P6) (aisladas de tejidos del omento de NDRI, siguiendo el protocolo usado para el aislamiento de células derivadas del posparto en el Ejemplo 1), células derivadas de adiposas (documento US6555374 B1) (P6) y fibroblastos (P6, CC2509) (Cambrex, Walkerville, MD) bajo las mismas condiciones. Antes del inicio de la adipogénesis, se cultivaron citoblastos mesenquimatosos en un medio de crecimiento de citoblastos mesenquimatosos Bullet kit (Cambrex, Walkerville, MD). Después de 2 días, el medio agotado se separó por aspiración y las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS). A continuación, el medio de cultivo se cambió a medio esencial mínimo de Dulbecco-alto en glucosa (DMEM-Hg; Invitrogen, Carlsbad, CA) que contenía 10 por ciento de FBS (v/v, Hyclone, Logan UT), 0,02 miligramos de insulina por mililitro (Sigma, St. Louis, MO) y 100 unidades de penicilina por mililitro, 100 miligramos de estreptomina por mililitro, 0,25 microgramos de anfotericina B por mililitro (Invitrogen, Carlsbad, CA). Una vez las células habían alcanzado la confluencia, se aspiró el medio agotado. A continuación, las células se cultivaron en un medio de diferenciación adiposa (DMEM-Hg (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contenía 10 por ciento de suero bovino fetal definido ((v/v), Hyclone, Logan, UT), 0,02 miligramos por mililitro de insulina (Sigma, St. Louis, MO) y 100 unidades de penicilina por mililitro, 100 microgramos de estreptomina por mililitro, 0,25 microgramos de anfotericina B por mililitro, isobutilmetilxantina 5 micromolar (Sigma, St. Louis, MO), dexametasona 100 micromolar (Sigma, St. Louis, MO) e indometacina 2,5 micromolar (Sigma, St. Louis, MO) durante hasta 4

semanas. Las células se tiñeron con Oil-Red-O para determinar la presencia de la formación de gotitas de lípidos.

Tinción con Oil-Red-O. Las células se fijaron con 10 por ciento (v/v) de formalina tamponada neutra (Richard-Allan Kalamazoo, MI). Después de la fijación, las células se lavaron en agua desionizada y se incubaron durante dos minutos en propilenglicol (absoluto; Poly Scientific, Bay Shore, NY). El propilenglicol se eliminó por aspiración, y las muestras se incubaron en Oil Red O (Poly Scientific) durante una hora. Se eliminó la disolución de tinción por aspiración y a continuación las muestras teñidas se incubaron en 85 por ciento (v/v) de disolución de propilenglicol (Poly Scientific) durante un minuto. Las muestras teñidas se lavaron con dos cambios de agua desionizada. Las muestras teñidas se contra-tiñeron con hematoxilina de Mayer (Poly Scientific) y se examinaron con microscopía óptica. Las imágenes se tomaron a aumentos 20 X.

Ensayo de leptina. Se sembraron células derivadas de adiposas y células derivadas del cordón umbilical a 200.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos tratadas con cultivo de tejido. Las células se sembraron inicialmente en medio de crecimiento, que se cambió a un medio de diferenciación adipogénica (medio DMEM-Hg; Invitrogen, Carlsbad, CA) que contenía dexametasona 1 micromolar (Sigma, St. Louis, MO), indometasona 0,2 milimolar (Sigma), 0,01 miligramos por microlitro de insulina (Sigma), isobutilmetilxantina 0,5 milimolar (Sigma), 10 por ciento (v/v) de suero bovino fetal (Cat. n° SH30070,03; Hyclone, Logan, UT), 100 unidades de penicilina por mililitro y 100 microgramos de estreptomocina por mililitro (Gibco). Al final del ensayo, el medio acondicionado se recogió y se midieron los niveles de leptina usando un kit de ELISA (Quantikine, R&D Systems, Mineápolis, MN).

Resultados

Diferenciación adiposa. MSC morfológicas y células derivadas de adiposas demostraron formación de lípidos ya 5 días en este ensayo. Se observaron grandes cantidades de formación de gotitas de lípidos en estos cultivos durante 15 días de cultivo. Los cultivos de osteoblastos también depositaron grandes cantidades de lípido bajo estas condiciones después de 10 días en cultivo y ampliamente a los 15 días. Se observó la formación de gotitas de lípidos en cultivos de células derivadas del cordón umbilical y del omento después de 15 días de cultivo. Se observó la formación de gotitas de lípido de bajo nivel en los cultivos de fibroblasto después de 20 días en condiciones inductoras adipogénicas.

Leptina. No se detectó leptina por ELISA en medio acondicionado de células derivadas del cordón umbilical.

Resumen. Aunque no se detectó leptina en las células derivadas del cordón umbilical por ELISA siguiendo los protocolos de diferenciación adipogénica usados, los datos demuestran claramente que las células derivadas del cordón umbilical se someten a bajo nivel de diferenciación en un fenotipo de adipocito cuando se compara con cultivos de citoblastos mesenquimatosos, células derivadas de adiposas u osteoblastos.

EJEMPLO 20

Diferenciación en el fenotipo de células beta

El páncreas contiene células endocrinas, organizadas en islotes de Langerhans, que producen insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático (PP). Se probó la capacidad de las células derivadas del cordón umbilical para diferenciarse hacia células con un fenotipo productor de insulina bajo ocho protocolos de inducción diferentes.

Métodos y materiales

Se cultivaron células derivadas del cordón umbilical (diversos aislados - véase más adelante), además de fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) neonatales o adultos, en medio de crecimiento, en matraces T75 recubiertos de gelatina, además de en diferentes condiciones de diferenciación promotoras de células beta. Los matraces se recubrieron con 2 % (peso/volumen) de disolución de gelatina (Sigma, St. Louis, MO) durante 20 minutos a temperatura ambiente. La disolución de gelatina se separó por aspiración y los matraces se lavaron con PBS. El factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento alfa transformante (TGF α) y factor de crecimiento de fibroblastos 10 (FGF-10) se compraron de PeproTech Inc. (Rocky Hill, NJ). GLP-1 se compró de Sigma (St. Louis, MO)

Se probaron los siguientes protocolos:

Protocolo 1:

Células: Se utilizaron células derivadas de adiposas (documento US 6.555.374) y células derivadas del omento, células derivadas del cordón umbilical, (P15), (P17), (P3) y fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) adultos (P10). Las células se mantuvieron bajo tanto condiciones normales como 5 % de O₂. Las células se sembraron a baja densidad (5.000 células/cm²) en matraces T75 recubiertos de gelatina sobre gelatina y se cultivaron en medio Ham's F12 (Clonetics, Santa Rosa, CA), 2 % (v/v) de FBS, penicilina (50 unidades/mililitro), estreptomocina (50 microgramos/mililitro), 10 nanogramos/mililitro de EGF, 20 nanogramos/mililitro de bFGF hasta confluencia. Las

ES 2 564 044 T3

células confluentes se tripsinaron y se sembraron a 50.000 células/cm² en placas de poliestireno de cultivo de tejido de 24 pocillos (TCPS; BD Biosciences, Bedford, MA) con o sin recubrimiento de gelatina o de colágeno. Las células se cultivaron en medio Ham's F12, 2 % de FBS, penicilina (50 unidades/mililitro), estreptomocina (50 microgramos/mililitro), 10 nanogramos/mililitro de EGF, 20 nanogramos/mililitro de bFGF y GLP-1 15 nanomolar (isoforma 7-37) durante hasta 3 semanas.

Protocolo 2:

Células: Se utilizaron células derivadas del cordón umbilical, aislado 2 (P17), aislado 1 (P15), aislado 4 (P10) y NHDF adultos P10. Las células se sembraron a 50.000 células/cm² en placas TCP de 24 pocillos y se cultivaron en medio DMEM:Ham's F12 (1:1), enriquecimiento con B-27 (Gibco, Carlsbad, CA), 50 unidades de penicilina por mililitro, 50 miligramos de estreptomocina por mililitro, 20 nanogramos/mililitro de EGF, 40 nanogramos/mililitro de bFGF. Se generaron agrupaciones esféricas - normalmente 4-6 días. Tras ese periodo, las agrupaciones esféricas se recogieron, se centrifugaron y se volvieron a sembrar sobre placas de 24 pocillos recubiertas de laminina (BD Biosciences, Bedford, MA) y se cultivaron hasta 3 semanas en medio enriquecido con B-27 que contenía GLP-1 10 nanomolar (7-37), pero no otros factores de crecimiento (es decir, sin bFGF y sin EGF).

Protocolo 3:

Células: Se utilizaron células derivadas del cordón umbilical, aislado 2 (P17) aislado 1 (P15), aislado 4 (P10), y NHDF adultos (P10). Las células se sembraron a alta densidad (50.000 células/cm²) en placas TCP de 24 pocillos y se cultivaron en medio DMEM:Ham's F12 (1:1), enriquecimiento con B-27, P/S, 20 nanogramos/mililitro de EGF, 40 nanogramos/mililitro de bFGF. Se generaron agrupaciones esféricas - normalmente 4-6 días. Tras ese periodo, las agrupaciones esféricas se recogieron, se centrifugaron y se volvieron a sembrar sobre placas de 24 pocillos recubiertas de laminina y se cultivaron hasta 3 semanas en medio enriquecido con B-27 que contenía GLP-1 10 nanomolar (isoforma 1-37), pero no otros factores de crecimiento (es decir, sin bFGF y sin EGF).

Protocolo 4:

Células: Se aislaron NHDF adultos (P15), derivadas del cordón umbilical, aislado 1 (P18), aislado 2 (P21), aislado 3 (P5), aislado 3 (P4), según el método por Mitchell et al. (2). Las células se sembraron a 50.000 células/cm² en placas recubiertas de gelatina TCP de 24 pocillos y se cultivaron en medio DMEM:Ham's F12 (1:1), enriquecimiento con B-27, penicilina (50 unidades/mililitro), estreptomocina (50 microgramos/mililitro), 10 nanogramos/mililitro de FGF-10 y/o 40 nanogramos/mililitro de TGF alfa durante más de dos semanas.

Protocolo 5:

Células: Se aislaron NHDF adultos, derivadas del cordón umbilical, aislado 1 (P18), aislado 2 (P21), aislado 3 (P5), aislado 3 (P4), según el método por Mitchell et al. (2). Las células se sembraron a 50.000 células/cm² en placas recubiertas de gelatina TCP de 24 pocillos y se cultivaron en medio EBM-2, 10 nanogramos/mililitro de FGF-10 y/o 40 nanogramos/mililitro de TGF alfa durante más de dos semanas.

Protocolo 6:

Células: Se utilizaron derivadas del cordón umbilical, aislado 3 (P2). Las células se sembraron a 5.000 células/cm² en matraces T75 sobre gelatina y se cultivaron tanto en medio de crecimiento como en medio Ham's F12, 2 % de FBS, penicilina (50 unidades/mililitro), estreptomocina (50 microgramos/mililitro), 10 nanogramos/mililitro de EGF, 20 nanogramos/mililitro de bFGF hasta confluencia. Las células confluentes se tripsinaron y se sembraron a 50.000 células/cm² en placas TCPS de 24 pocillos, con o sin recubrimiento de gelatina. Se usaron tres tipos de medios básicos durante hasta 3 semanas:

Medio beta I: medio Ham's F12, 2 % de FBS, nicotinamida 10 milimolar, penicilina (50 unidades/mililitro), estreptomocina (50 microgramos/mililitro), glucosa 25 milimolar;

Medio beta II: Partes iguales de medios DMEM/Ham's F12, 2 % de FBS, nicotinamida 10 milimolar, glucosa 25 milimolar; y

Medio basal de células endoteliales (EBM), (Clonetics, Santa Rosa, CA).

Se añadieron los siguientes factores de crecimiento a cada uno de los medios: 10 nanogramos/mililitro de EGF, 20 nanogramos/mililitro de bFGF, GLP-1 10 nanomolar (isoforma 7-37).

Aislamiento de ARN total y RT-PCR cuantitativa. Se extrajo ARN de las células derivadas del cordón umbilical y los fibroblastos se cultivaron como se describe en cada protocolo. Las células se lisaron con 350 microlitros de tampón RLT que contenía beta-mercaptoetanol (Sigma St. Louis, MO) según las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA) y el ARN se extrajo según las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA) con un tratamiento con DNasa de 2,7 unidades/muestra (Sigma). El ARN se eluyó con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se guardó a -80 °C. El ARN se transcribió de forma inversa usando

hexámeros al azar con los reactivos de transcripción inversa TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA) a 25 °C durante 10 minutos, 37 °C durante 60 minutos y 95 °C durante 10 minutos. Las muestras se almacenaron a -20 °C.

PCR en tiempo real. Se realizó PCR en muestras de ADNc usando productos de expresión génica ASSAYS-ON-DEMAND. PDX-1 (Hs00426216), pro-insulina (Hs00355773), Ngn-3 (Hs00360700) y Glut-2 (Hs00165775) GAPDH (Applied Biosystems, Foster City, CA) y la mezcla maestra de PCR TaqMan Universal según las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando un sistema de detección de secuencias 7000 con el software ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las condiciones de los ciclos térmicos fueron inicialmente 50 °C durante 2 minutos y 95 °C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minutos. Además, se probó otro conjunto de cebadores diseñado internamente para PDX-1 y Ngn-3. La Tabla 20-1 contiene secuencias de cebadores. La PCR usando estos cebadores se realizó como se ha descrito anteriormente. Se usó ARN total de páncreas (Ambion, Austin, TX) como control. Los datos de PCR se analizaron según el método $\Delta\Delta CT$ recomendado por Applied Biosystems (1).

Tabla 20-1.

Nombre cebador	Secuencia
PDX-1 cebador directo	5'-CTGGATTGGCGTTGTTTGTG-3' (SEQ ID NO:11)
PDX-1 Cebador inverso	5'-TCCCAAGGTGGAGTGCTGTAG-3' (SEQ ID NO:12)
Prueba PDX-1-TaqMan	5'-CTGTTGCGCACATCCCTGCC-3' (SEQ ID NO:13)
Ngn-3 cebador directo	5'-GGCAGTCTGGCTTCTCAGATT-3' (SEQ ID NO:14)
Ngn-3 Cebador inverso	5'-CCCTCTCCCTTACCCTTAGCA-3' (SEQ ID NO:15)
Prueba Ngn-3 TaqMan	5'-CTGTGAAAGGACCTGTCTGTGCG-3' (SEQ ID NO:16)

Inmunofluorescencia. Se recogió tejido pancreático humano adulto y se fijó por inmersión en 4 % (peso/volumen) de paraformaldehído (Sigma, St. Louis, MO) durante la noche a 4 °C. Se realizó inmunohistoquímica usando anticuerpos dirigidos contra los siguientes epítopes: insulina (suero de insulina; 1:50; LINCO Research, St. Charles, MO), PDX-1 (1:50; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), glucagón (1:100; Santa Cruz Biotech), somatostatina (1:100; DakoCytomation, Carpinteria, CA) y citoqueratina 18 (CK18; 1:400; Sigma, St. Louis, MO). Brevemente, se bloquearon especímenes fijados con un bisturí y se dispusieron dentro de compuesto de incorporación OCT (Tissue-Tek OCT; Sakura, Torrance, CA) sobre un baño de nieve carbónica que contenía etanol. A continuación, los bloques congelados se seccionaron (10 micrómetros de espesor) usando un criostato estándar (Leica Microsystems) y se montaron sobre portaobjetos de vidrio para tinción.

Las secciones de tejido se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una disolución de bloqueo de proteína que contenía PBS, 4 % (v/v) de suero de cabra (Chemicon, Temecula, CA) y 0,3 % (v/v) de Triton (Triton X-100, Sigma) durante 1 hora. A continuación, se aplicaron los anticuerpos primarios, diluidos en disolución de bloqueo, a las muestras durante un periodo de 4 horas a temperatura ambiente. A continuación se eliminaron las disoluciones de anticuerpos primarios y las muestras se lavaron con PBS antes de la aplicación de disoluciones de anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente que contenían disolución de bloqueo junto con cabra anti-IgG de ratón-Texas Red (1:250; Molecular Probes, Eugene, OR) para CK18, cabra anti-IgG de conejo-Alexa 488 (1:250; Molecular Probes) para glucagón y somatostatina, cabra anti-IgG de cobaya-FITC (1:150; Santa Cruz Biotech) para insulina, o burro anti-IgG de cabra-FITC (1:150; Santa Cruz Biotech) para la tinción de PDX-1. A continuación, las muestras se lavaron y se aplicó DAPI 10 micromolar (Molecular Probes) durante 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.

Tras la inmunotinción, la fluorescencia se visualizó usando el filtro de fluorescencia apropiado sobre un microscopio epi-fluorescente invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). Se capturaron imágenes representativas usando una cámara de vídeo en color digital y el software ImagePro (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para muestras teñidas triplemente, cada imagen se tomó usando solo un filtro de emisión cada vez. A continuación se prepararon montajes en capas usando el software Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA).

Resultados

Para las células derivadas del cordón umbilical tratadas según los protocolos 1-6, no se detectó la expresión de marcador específico del páncreas usando PCR en tiempo real y cebadores de ASSAYS-ON-DEMAND, con la excepción de que se detectaron bajos niveles de Ngn-3 en las células del protocolo 6. Los mismos cebadores produjeron resultados positivos con ADNc derivado de ARN de tejido pancreático.

Se realizó PCR en tiempo real para ngn-3 en muestras de ADNc derivadas de cordón umbilical humano cultivadas según el protocolo 6. También se realizó PCR usando cebadores Ngn-3 de ASSAYS-ON-DEMAND (Hs00360700).

Se usó ADNc derivado de páncreas humano como control. No se detectaron otros marcadores específicos del páncreas (PDX-1, pro-insulina o Glut-2) con los cebadores de ASSAYS-ON-DEMAND.

5 Las condiciones experimentales en los protocolos 2 y 6 aplicadas a tejidos derivados del cordón umbilical, pero no fibroblastos, produjeron estructuras que se parecieron al ensamblaje celular de células epiteliales pancreáticas en islotes. Estas estructuras emergieron 3-5 días después de la implementación del protocolo. Sin embargo, a diferencia de los islotes, estas estructuras fueron negativas para la expresión de marcadores pancreáticos (PDX-1, Ngn3, Glut-2 y pro-insulina) (probados por PCR en tiempo real).

10 Se detectaron marcadores específicos del páncreas en tejido derivado de un páncreas humano usando la técnica de inmunofluorescencia y una matriz de anticuerpos (véase materiales y métodos). La expresión de marcadores específicos del páncreas (por ejemplo, insulina, PDX-1, glucagón, somatostatina y citoqueratina 18) en tejido pancreático humano fue fácilmente detectable.

15 **Resumen.** Se ha observado expresión limitada de PDX-1 y Ngn-3 en las células derivadas del cordón umbilical tratadas con una variedad de protocolos experimentales. Hubo diferencias en los resultados entre los cebadores diseñados internamente y comercialmente disponibles. Por ejemplo, mientras que el protocolo número 1 dio datos positivos para PDX-1 y Ngn-3 usando cebadores diseñados internamente, los cebadores de ASSAYS-ON-DEMAND para los mismos genes produjeron datos negativos. Los resultados no se verificaron directamente por técnicas inmunológicas. A pesar de tales diferencias, se ha llevado a cabo la expresión de varios marcadores pancreáticos, sugiriendo el potencial de las células derivadas del cordón umbilical para diferenciarse hacia los fenotipos pancreáticos.

25 **Referencia para el Ejemplo 20**

- 25 1. Boletín del usuario nº 2 de Applied Biosystems para el sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700
- 30 2. Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Martin P, Davis D, Morales L, Helwig B, Beerenstrauch M, Abou-Easa K, Hildreth T, Troyer D, Medicetty S. (2003) Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. Stem Cells 21(1):50-60.
- 35 3. H. Edlund. (2002) Pancreatic organogenesis - developmental mechanisms and implications for therapy. Nat. Rev. Genet. 3:524-532.
4. S.K. Kim and M. Hebrok. (2001) Intercellular signals regulating pancreas development and function. Genes Dev. 15:111-127.
5. Street CN, Rajotte RV, Korbitt GS. (2003) Stem cells: a promising source of pancreatic islets for transplantation in type 1 diabetes. Curr Top Dev Biol. 58:111-36.

EJEMPLO 21

40 **Diferenciación condrogénica de células derivadas del cordón umbilical**

El daño y los defectos del cartílago conducen a aproximadamente 600.000 procedimientos quirúrgicos cada año en los Estados Unidos solo (1). Se han desarrollado varias estrategias para tratar estas afecciones, pero éstas han tenido éxito limitado. Un enfoque, Cartecel (Genzyme), usa condrocitos autólogos que se recogen de un paciente, se expanden *in vitro* y a continuación se implantan en el paciente (1). Este enfoque tiene la desventaja de recoger cartílago sano y que requiere un segundo procedimiento para implantar las células cultivadas. Una posibilidad alternativa es una terapia basada en citoblastos en la que las células se disponen en o cerca del sitio del defecto para sustituir directamente el tejido dañado. Las células pueden diferenciarse en condrocitos antes de la aplicación o pueden usarse células progenitoras que pueden diferenciarse *in situ*. Tales células trasplantadas sustituirían a los condrocitos perdidos en el defecto.

Células candidatas para esta indicación deben evaluarse para su capacidad para diferenciarse en condrocitos *in vitro*. Se han desarrollado varios protocolos para probar la capacidad de células para diferenciarse y expresar genes marcadores de condrocitos. Se probaron células derivadas del cordón umbilical para su capacidad para diferenciarse en condrocitos *in vitro* en dos sistemas de ensayo diferentes: el sistema de cultivo de ensayo de sedimentos y los cultivos de gel de colágeno. El sistema de cultivo de sedimentos se ha usado satisfactoriamente con lotes seleccionados de citoblastos mesenquimatosos (MSC) humanos. Se ha mostrado que MSC cultivados en este ensayo y tratados con factor de crecimiento-beta3 transformante se diferencian en condrocitos (2). El sistema de gel de colágeno se ha usado para cultivar condrocitos *in vitro* (3). Los condrocitos cultivados bajo estas condiciones forman una estructura similar a cartílago.

Materiales y métodos

65 **Cultivo celular.** Se recibieron cordones umbilicales humanos y las células derivadas del cordón umbilical se prepararon como se ha descrito en el Ejemplo 1 anteriormente. Las células se cultivaron en medio de crecimiento sobre matraces TCP recubiertos de gelatina. Los cultivos se incubaron con 5 % de CO₂ a 37 °C. Las células usadas

en los experimentos oscilaron de los pases 4 a 12.

Se compraron condrocitos articulares humanos de Cambrex (Walkersville, MD) y se cultivaron en el mismo medio que las células posparto. Veinticuatro horas antes del experimento, el medio de cultivo se cambió a un medio que contenía 1 % de FBS.

Se compraron citoblastos mesenquimatosos humanos (hMSC) de Cambrex (Walkersville, MD) y se cultivaron en MSCGM (Cambrex). Las células usadas para los experimentos estuvieron entre los pases 2 y 4.

Ensayos de gel de colágeno. Se tripsinaron células cultivadas para eliminarlas de la placa de cultivo. Las células se lavaron con centrifugación dos veces a 300 x g durante 5 minutos en DMEM sin suero y se contaron. Las células se mezclaron con los siguientes componentes a las concentraciones finales enumeradas. Colágeno de cola de rata (1 miligramo/mililitro, BD Discovery Labware, Bedford, MA), NaOH 0,01 normal y medio celular de condrocitos DMEM, penicilina (100 unidades/mililitro), estreptomycin (100 microgramos/mililitro), L-glutamina 2 milimolar, piruvato de sodio 1 milimolar, L-prolina 0,35 milimolar, dexametasona 100 nanomolar, ácido L-ascórbico 0,17 milimolar, 1 % (v/v) de ITS (insulina, transferrina, selenio) (todos los componentes de Sigma Chemical Company). Las células se mezclaron suavemente con el medio, las muestras se tomaron en alícuotas en pocillos individuales de una placa de 24 pocillos de agrupaciones ultra-bajas (Corning, Corning, NY) a una concentración de tanto 2×10^5 por pocillo como 5×10^5 por pocillo. Los cultivos se dispusieron en una estufa de incubación y se dejaron sin perturbar durante 24 a 48 horas. El medio se sustituyó con medio de condrocitos fresco enriquecido con factor de crecimiento apropiado cada 24 a 48 horas. Las muestras se dejaron cultivar durante hasta 28 días, momento en el que se extrajeron y se dejaron en 10 % (v/v) de formalina (VWR Scientific, West Chester, PA) y se procesaron para examen histológico. Las muestras se tiñeron con Safranin O o hematoxilina/eosina para la evaluación.

Ensayos de cultivo de sedimentos. Se tripsinaron células cultivadas para eliminarlas de la placa de cultivo. Las células se lavaron con centrifugación dos veces a 300 x g durante 5 minutos en DMEM sin suero y se contaron. Las células se resuspendieron en medio de condrocitos fresco (descrito anteriormente) a una concentración de 5×10^5 células por mililitro. Las células se tomaron en alícuotas en tubos de polipropileno nuevos a $2,5 \times 10^5$ células por tubo. A continuación, las muestras apropiadas se trataron con TGF-beta3 (10 nanogramos/mililitro, Sigma) o GDF-5 (100 nanogramos/mililitro; R&D Systems, Mineápolis, MN). A continuación, las células se centrifugaron a 150 x g durante 3 minutos. A continuación, los tubos se transfirieron a la estufa de incubación y se dejaron sin perturbación durante 24-48 horas en 5 % de CO₂ a 37 °C. El medio se sustituyó con medio celular de condrocitos fresco y factor de crecimiento, cuando corresponda, cada 2-3 días. Las muestras se dejaron cultivar durante hasta 28 días, momento en el que se eliminaron y se fijaron y se tiñeron como se ha descrito anteriormente.

Resultados

Se prepararon sedimentos y se cultivaron y se describieron en Métodos. Los sedimentos se cultivaron en medio (control), o medio enriquecido con TGF beta3 (10 nanogramos/mililitro) o GDF-5 (100 nanogramos/mililitro), que se sustituyó cada 2 a 3 días. Los sedimentos se recogieron después de 21 días de cultivo y se tiñeron por Safranin O para probar la presencia de glucosaminoglicanos. Los sedimentos tratados con TGFbeta3 y GDF-5 mostraron alguna tinción de Safranin O positiva en comparación con células de control. La morfología de las células del cordón umbilical mostró alguna morfología similar a condrocitos limitada.

Resumen. Células derivadas del cordón umbilical se diferenciaron parcialmente en condrocitos *in vitro* en los sistemas de ensayo de cultivo de sedimentos y de gel de colágeno. Las células derivadas del cordón umbilical mostraron algunas indicaciones de expresión de glucosaminoglicanos por las células. La morfología mostró similitud limitada con el tejido de cartílago. Estos resultados sugieren que las condiciones pueden optimizarse para estimular diferenciación de condrocitos más completa de las células derivadas del cordón umbilical.

Referencia para el Ejemplo 21

1. U.S. Markets for Current and Emerging Orthopedic Biomaterials Products and Technologies. Medtech Insight L.L.C. 2002
2. Johnstone, B, T. M. Hering, A.I. Caplan, V.M. Goldberg and J.U. Yoo. In Vitro Chondrogenesis of Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. 1998. Exp Cell Res 238:265-272.
3. Gosiewska, A., A. Reznia, S. Dhanaraj, M. Vyakarnam, J. Zhou, D. Burtis, L. Brown, W. Kong, M. Zimmerman and J. Geesin. Development of a Three-Dimensional Transmigration Assay for Testing Cell-Polymer Interactions for Tissue Engineering Applications. 2001 Tissue Eng. 7:267-277.

EJEMPLO 22

Evaluación adicional del potencial condrogénico de células derivadas de tejido del cordón umbilical en un ensayo basado en cultivo de sedimentos *in vitro*

Se realizó la evaluación del potencial condrogénico de células derivadas de tejido umbilical usando ensayos basados

en cultivo de sedimentos *in vitro*. Se usaron células del cordón umbilical en el pase temprano (P3) y el pase tardío (P12). El potencial condrogénico de las células se evaluó en ensayos de cultivo de sedimentos, bajo condiciones de inducción condrogénica en medio enriquecido con factor de crecimiento beta-3 transformante (TGFbeta-3), factor 5 de crecimiento y diferenciación humano recombinante (rhGDF-5), o una combinación de ambos.

5

Materiales y métodos

Reactivos. Se obtuvieron medio esencial modificado por Dulbecco (DMEM), penicilina y estreptomocina de Invitrogen, Carlsbad, CA. Se obtuvo suero de ternero fetal (FCS) de HyClone (Logan, UT). Se obtuvieron medio de crecimiento de citoblastos mesenquimatosos (MSCGM) y hMSC Chondrogenic Differentiation Bullet Kit de Biowhittaker, Walkersville, MD. TGFbeta-3 se obtuvo de Oncogene Research Products, San Diego, CA. rhGDF-5 se obtuvo de Biopharm, Heidelberg, Alemania (documentos WO9601316 A1, US5994094 A).

10

Células. Se obtuvieron citoblastos mesenquimatosos humanos (lote nº 2F1656) de Biowhittaker, Walkersville, MD, y se cultivaron en MSCGM según instrucciones del fabricante. Este lote se ha probado previamente, y se mostró que era positivo en los ensayos de condrogénesis. Se obtuvieron fibroblastos adultos y neonatales humanos de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Manassas, VA, y se cultivaron en medio de crecimiento en matraces de plástico de cultivo de tejido recubiertos de gelatina. Se utilizaron células derivadas de tejido posparto, aisladas de cordones umbilicales humanos, como se ha descrito en ejemplos previos. Las células se cultivaron en medio de crecimiento de un modo similar al cultivo de los fibroblastos. Los cultivos celulares se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂. Las células usadas para los experimentos estuvieron en los pases 3 y 12.

15

20

Ensayo de cultivo de sedimentos. Para cultivos de sedimentos, se dispusieron 0,25 x 10⁶ células en un tubo cónico de 15 mililitros y se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente para formar un sedimento esférico según el protocolo para el ensayo condrogénico de Biowhittaker. Los sedimentos se cultivaron en medio de inducción condrogénica que contenía TGFbeta-3 (10 nanogramos/mililitro), rhGDF-5 (500 nanogramos/mililitro), o una combinación de TGFbeta-3 (10 nanogramos/mililitro) y rhGDF-5 (500 nanogramos/mililitro) durante tres semanas. Los controles no tratados se cultivaron en medio de crecimiento. Durante el cultivo, los sedimentos se re-alimentaron con medio fresco cada dos días. Los grupos de tratamiento incluyeron los siguientes:

25

30

Grupo de tratamiento

- A. Células derivadas del cordón umbilical pase temprano (U EP) + rhGDF-5
- B. Células derivadas del cordón umbilical pase tardío (U LP) + rhGDF-5, n=2
- C. Citoblastos mesenquimatosos humanos (HMSC) + rhGDF-5
- D. Células de fibroblastos adultos humanos (HAF) + rhGDF-5
- E. Células derivadas del cordón umbilical pase temprano (U EP) + TGFbeta-3
- F. Células derivadas del cordón umbilical pase tardío (U LP) + TGFbeta-3, n=2
- G. Citoblastos mesenquimatosos humanos (HMSC) + TGFbeta-3
- H. Células de fibroblastos adultos humanos (HAF) + TGFbeta-3
- I. Células derivadas del cordón umbilical pase temprano (U EP) + rhGDF-5 + TGFbeta-3
- J. Células derivadas del cordón umbilical pase tardío (U LP) + rhGDF-5 + TGFbeta-3, n=2
- K. Citoblastos mesenquimatosos humanos (HMSC) + rhGDF-5+ TGFbeta-3
- L. Células de fibroblastos adultos humanos (HAF) + rhGDF-5+ TGFbeta-3
- M. Human neonatal fibroblasto células (HNF) + rhGDF-5+ TGFbeta-3
- N. Células derivadas del cordón umbilical pase temprano (U EP)
- O. Células derivadas del cordón umbilical pase tardío (U LP)
- P. Citoblastos mesenquimatosos humanos (HMSC)
- Q. Células de fibroblastos adultos humanos (HAF)

35

40

45

50

Histología de muestras *in vitro*. Al final del periodo de cultivo, los sedimentos se fijaron en 10 % de formalina tamponada y se enviaron a MPI Research (Mattawan, MI) para la incorporación en parafina, seccionamiento y tinción con hematoxilina y eosina (H&E) y tinción con Safranin O (SO).

55

Resultados

Las células derivadas del cordón umbilical, MSC, y fibroblastos formaron sedimentos de células en medio de inducción condrogénico con los diferentes factores de crecimiento. El tamaño de los sedimentos al final del periodo de cultivo varió entre los diferentes tipos de células. Los sedimentos formados con las células umbilicales tendieron a ser mayores y a estar más sueltos que aquellos formados por MSC y fibroblastos. Los sedimentos formados con todos los tipos de células y cultivados en medio de control fueron más pequeños que los sedimentos cultivados en medio de inducción condrogénico.

60

El examen de secciones transversales de sedimentos teñidos con H&E y Safranin O mostró que las células derivadas del cordón umbilical en el pase temprano tuvieron el potencial de experimentar diferenciación

65

condrogénica. Se observó condrogénesis, como se evalúa por condensación celular, morfología celular y tinción positiva para Safranin O de la matriz, en los sedimentos umbilicales de células cultivadas en medio de inducción condrogénica enriquecido con TGFbeta-3, rhGDF-5 o ambos. La condrogénesis en sedimentos fue similar para TGFbeta-3, rhGDF-5 y los tratamientos combinados. Los sedimentos de control cultivados en medio de crecimiento no mostraron evidencia de condrogénesis. El potencial condrogénico de las células derivadas del cordón umbilical fue marginalmente menor que el observado con las MSC obtenidas de Biowhittaker.

Las células derivadas del cordón umbilical en el pase tardío no demostraron un potencial condrogénico tan distinto como las células derivadas de umbilical de pase temprano. Sin embargo, esto puede ser debido al hecho de que las condiciones de inducción condrogénica se optimizaron para MSC, no para las células derivadas del posparto. Se observó alguna condensación de células con fibroblasto, pero no se asoció a tinción con Safranin O.

EJEMPLO 23

Diferenciación al fenotipo de cardiomiocitos

Hay una tremenda necesidad de terapia que ralentizará la progresión de y/o cura de enfermedad cardíaca, tal como enfermedad cardíaca isquémica e insuficiencia cardíaca congestiva. Son altamente deseables células que pueden diferenciarse en cardiomiocitos que pueden integrarse completamente en el músculo cardíaco del paciente sin arritmias. Se ha mostrado que citoblastos mesenquimatosos de roedor tratados con 5-azacitidina expresan marcadores de cardiomiocitos (Fukuda et al. (2002) C. R. Biol. 325:1027-38). Esto no se ha mostrado para citoblastos humanos adultos. Se han usado factores adicionales para mejorar la diferenciación de citoblastos que incluyen bajo oxígeno (Storch (1990) Biochim. Biophys. Acta 1055:126-9), ácido retinoico (Wobus et al. (1997) J. Mol. Cell Cardiol. 29:1525-39), DMSO (Xu et al. (2002) Circ. Res. 91:501-8) y cloruro de queleritrina (publicación PCT internacional N° WO03/025149), que efectúa la translocalización de PKC del citosol a la membrana plasmática y es un inhibidor de la actividad de PKC.

En este ejemplo, las células derivadas del cordón umbilical se trataron con 5-azacitidina tanto sola como en combinación con DMSO o cloruro de queleritrina y los marcadores de cardiomiocitos se midieron por PCR en tiempo real.

Métodos y materiales

Células. Se cultivaron células derivadas del cordón umbilical criopreservadas (P10) en medio de crecimiento en matraces recubiertos de gelatina. Las células se sembraron a 5×10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos en medio de crecimiento durante 24 horas. El medio se cambió a 5-azacitidina 0, 3, 10 y 30 micromolar (Sigma, St. Louis, MO) sola o con cloruro de queleritrina 5 microM (Sigma), 1 % (v/v) de sulfóxido de dimetilo (DMSO) (Sigma), o ácido retinoico 1 micromolar (Sigma) en MEM-alfa (Sigma), insulina, transferrina y selenio (ITS; Sigma), 10 % (v/v) de suero bovino fetal, penicilina y estreptomina. Las células se incubaron a 37 °C, 5 % (v/v) de O₂ durante 48 - 72 horas. El medio se cambió a MEM-alfa, insulina, transferrina y selenio, 10 % (v/v) de suero bovino fetal, penicilina (50 unidades/mililitro) y estreptomina (50 microgramos/mililitro), y las células se incubaron a 37 °C, 5 % (v/v) de O₂ durante 14 días.

Extracción de ARN y transcripción inversa. Las células se lisaron con 150 microlitros de tampón RLT que contenía beta-mercaptoetanol (Sigma St. Louis, MO) según las instrucciones del fabricante (kit RNeasy 96, Qiagen, Valencia, CA) y se guardaron a -80 °C. Se descongelaron lisados celulares y el ARN se extrajo según las instrucciones del fabricante (kit RNeasy 96, Qiagen, Valencia, CA) con un tratamiento con DNasa de 2,7 unidades/muestra (Sigma St. Louis, MO). El ARN se eluyó con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se guardó a -80 °C. El ARN se transcribió de forma inversa usando hexámeros al azar con los reactivos de transcripción inversa TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA) a 25 °C durante 10 minutos, 37 °C durante 60 minutos y 95 °C durante 10 minutos. Las muestras se almacenaron a -20 °C.

PCR. Se realizó PCR en muestras de ADNc usando productos de expresión génica ASSAYS-ON-DEMAND para miosina cardíaca (Hs00165276 ml), miosina esquelética (Hs00428600), GATA 4 (Hs00171403 ml), GAPDH (Applied Biosystems, Foster City, CA) y la mezcla maestra de PCR TaqMan Universal según las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando un sistema de detección de secuencias 7000 con el software ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems). Las condiciones de los ciclos térmicos fueron inicialmente 50 °C durante 2 minutos y 95 °C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto. Se usaron ADNc de corazón y músculo esquelético (Ambion, Austin TX) como controles.

Resultados

El ARN de control de músculo cardíaco mostró expresión de miosina cardíaca y GATA 4, el ARN de músculo esquelético mostró expresión de miosina esquelética y miosina cardíaca, pero no de GATA 4. Las células derivadas del cordón umbilical (P12) tratadas durante 48 h con factores y cultivadas durante otros 14 días expresaron bajos niveles de GATA 4, pero no miosina esquelética o miosina cardíaca. Muestras adicionales de las células derivadas

del cordón umbilical también mostraron expresión de GATA 4.

Resumen. Las células derivadas del cordón umbilical sin tratar expresan constitutivamente GATA 4, un factor de transcripción nuclear en cardiomiocitos, células de Sertoli y hepatocitos.

EJEMPLO 24

Evaluación de células derivadas del cordón umbilical para terapia cardiovascular en un modelo de ligadura coronaria de roedor

Los modelos animales de insuficiencia cardíaca han facilitado el entendimiento de la patofisiología de la enfermedad y han ayudado en el desarrollo de nuevos tratamientos para insuficiencia cardíaca congestiva (ICC). La ligadura de la arteria coronaria, o el bloqueo de los vasos que suministran al tejido del corazón, en la rata imitan estrechamente la patofisiología del infarto agudo de miocardio en seres humanos y se ha usado satisfactoriamente para estudiar intervenciones farmacológicas para ICC. El trasplante de células de células humanas en lesiones cardíacas es un posible tratamiento terapéutico viable para ICC.

Se evaluó la eficacia del tratamiento con células derivadas del cordón umbilical humano intracardíaco cuando se administra 15 minutos después de la oclusión de la arteria coronaria en un modelo de roedor de isquemia miocárdica/infarto.

Métodos y materiales

La instalación de pruebas de Charles River Worcester, MA, está acreditada por la Asociación para la evaluación y acreditación del cuidado de animales de laboratorio, International (AAALAC) y registrada en el Departamento de agricultura de los Estados Unidos para realizar investigación en animales de laboratorio. Todas las condiciones de prueba cumplieron el Acta de bienestar de animales (9 CFR) y sus modificaciones. El protocolo fue revisado y autorizado por el Comité institucional de cuidado y uso de animales (IACUC) en la instalación de prueba para el cumplimiento de normas antes del inicio del estudio.

Los animales que tienen características identificadas en la Tabla 25-1 se alojaron individualmente en jaulas Micro-Isolator sobre lecho esterilizado en autoclave. Las jaulas cumplieron las normas expuestas en The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Tabla 25-1. Características de los animales

Especies	<i>Rattus norvegicus</i>
Tensión	Rnu
Fuente	Laboratorios Charles River
Edad en Dosis	6-8 semanas
Peso en Dosis	200-250 gramos
Numero de machos (incluyendo repuestos):	40 + 10

Se proporcionó dieta certificada de Purina (irradiada) a los animales a voluntad. Esta dieta se analizó rutinariamente por el fabricante para componentes nutricionales y contaminantes medioambientales. Los resultados de los análisis del fabricante están en los archivos en la instalación de prueba.

Se proporcionó agua de grifo filtrada esterilizada en autoclave a voluntad. Se analizaron muestras de agua filtrada para sólidos disueltos totales, dureza, contenido microbiológico especificado y contaminantes medioambientales seleccionados. Los resultados de estos análisis están en los archivos en la instalación de prueba.

Se establecieron controles medioambientales para mantener temperaturas de 18 a 26 °C (64 a 79°F) con humedad relativa del 30 % al 70 %. Se mantuvo un ciclo de 12:12 horas de luz:oscuridad. Se mantuvieron diez o más cambios de aire por hora en las salas de animales. Tras la recepción y antes del uso en el estudio, los animales se mantuvieron durante un mínimo de cuatro días para acondicionamiento según el Programa de gestión del vendedor de la instalación de prueba como se describe en el Procedimiento de operación estándar de la instalación, recepción, acondicionamiento y cuarentena de animales de laboratorio.

Cada animal se identificó por un número único indicado por una perforación en la oreja. Los animales se asignaron aleatoriamente a grupos por una distribución de peso ordenado de forma que los pesos corporales individuales no superaran ± 20 % de peso medio.

Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (40 miligramos/kilogramo) y buprenorfina (0,05 miligramos/kilogramo) como una mezcla única administrada intramuscularmente (IM). Tras el establecimiento de la

anestesia, los animales se intubaron usando angiocatéteres de 2 pulgadas de longitud de 18 a 16 de calibre, o angiocatéter de tamaño apropiado, y se mantuvieron en respiración con aire de la sala (enriquecido con oxígeno) y un respirador de presión positiva durante todo el procedimiento quirúrgico. Se administró anestesia adicional incrementalmente según se necesitara. También se administró terapia preoperatoria con antibiótico, penicilina G benzatina/procaína, 40.000 unidades/kilogramo, IM. Se administró terapia con antibiótico adicional cada 48 horas.

Se colocaron almohadillas de electrodo alrededor de las patas apropiadas de los animales para recibir una señal de ECG utilizable. Los animales se colocaron sobre una almohadilla calefactora para ayudar a mantener la temperatura corporal durante todo el procedimiento. Se insertó una sonda de temperatura rectal en el animal para monitorizar la temperatura corporal. Se administró pomada oftálmica a cada ojo. Los sitios quirúrgicos (área torácica) se prepararon para cirugía aséptica eliminando cualquier pelo en exceso, y limpiando suavemente el área con esponjas empapadas en 70 % de alcohol isopropílico, que se dejó secar. Entonces se aplicó Yodone (MEDISEPPS, o disolución similar) al área y se dejó secar. El área se vendó apropiadamente para cirugía aséptica estricta.

Se hizo una incisión quirúrgica sobre la piel sobre el cuarto espacio intercostal. Se usó disección roma a través de las capas de músculo para acceder a la cavidad torácica. Se insertó cuidadosamente un retractor en el cuarto espacio intercostal y se abrió para permitir el acceso a la cavidad interior. Se abrió cuidadosamente el pericardio provocándolo suavemente con hisopos de algodón humedecidos en solución salina estéril. Se usó un hisopo de algodón húmedo para presionar suavemente la punta del corazón en la abertura en la que se unió una longitud de sutura de seda 6-0 en el miocardio para la manipulación del corazón. Después de una pausa para permitir que el corazón se recuperara, la sutura colocada en la punta se usó para sacar con cuidado el corazón de la cavidad torácica y para poner tensión suficiente sobre el corazón para permitir el acceso al corazón superior y la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD). Se colocó otra longitud de sutura de seda 6-0 en el miocardio de manera que rodeara la LAD. Se liberó la presión sobre la sutura apical y se dejó que el corazón volviera al interior de la cavidad torácica.

Una vez la frecuencia cardíaca y el ECG volvieron a los valores iniciales, las ligaduras alrededor de la LAD se ataron para ocluir la LAD. Esto fue una oclusión permanente con la sutura atada y los extremos cortados. Después de atarse la ligadura, el cirujano buscó las siguientes indicaciones de oclusión satisfactoria: cambio en el color del área del corazón directamente por debajo de la ligadura a uno blanco/blanco grisáceo como resultado de la terminación de la circulación sanguínea al área y un cambio significativo en el ECG correspondientes a la oclusión de la LAD. Pueden haberse desarrollado arritmias dentro de los 10 primeros minutos desde la oclusión. La rata se monitorizó estrechamente durante este periodo de tiempo en el supuesto caso de que se necesitara reanimación. En el caso de arritmia grave y fallo de la rata en cambiar a ritmo sinusal normal sin ayuda, la ayuda se prestó mediante masaje cardíaco. Aproximadamente 15 minutos tras el inicio de la oclusión de la LAD, el área del ventrículo izquierdo hecha isquémica se trató con tanto vehículo como artículo de prueba por inyección directa en el miocardio isquémico. El tratamiento consistió en tres a diez inyecciones intramiocárdicas (100 ul/inyección) en la zona isquémica del miocardio.

Se cultivaron células humanas en medio de crecimiento en matraces T300 recubiertos de gelatina. Las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS, Gibco, Carlsbad CA) y se tripsinaron usando tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad CA). La tripsinización se detuvo añadiendo medio de crecimiento. Las células se centrifugaron a 150 x g, se eliminó el sobrenadante y el sedimento de células se resuspendió en aproximadamente 1 mililitro de medio de crecimiento por millón de células. Se extrajo una alícuota de células y se añadió a azul de tripano (Sigma, St. Louis, MO). El número de células viables se estimó usando un hemocitómetro. La suspensión de células se centrifugó y se resuspendió en 1 mililitro de medio de crecimiento que contenía 10 % (v/v) de DMSO (Hybrimax, Sigma, St. Louis, MO) por 5 millones de células y transfirió a crioviales (Nalgene). Las células se enfriaron a aproximadamente 1 °C/minuto durante la noche en un congelador a -80 °C usando un recipiente de congelación "Mr. Frosty" (Nalgene, Rochester, NY). Se transfirieron viales de células a nitrógeno líquido. Los viales se transportaron de CBAT, Somerville, NJ, a Charles River, Worcester, MA, sobre nieve carbónica y se guardaron a -80 °C. Aproximadamente 1-2 horas antes de la inyección de las células en el animal, un vial de células se descongeló rápidamente en un baño de agua a 37 °C. Bajo condiciones asépticas en una vitrina de bioseguridad BSL2, las células se añadieron a 40 mililitros de PBS con magnesio y calcio (Sigma St. Louis, MO) y se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos antes resuspender el sedimento de células en 10 mililitros de PBS. El número de células y la viabilidad se estimó como se ha descrito anteriormente. Las células se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos y se resuspendieron en PBS a una concentración final de 10^6 células viables /100 microlitros. La suspensión de células se cargó en jeringas de 1 mililitro con una aguja 30G y se mantuvo sobre hielo. La viabilidad se evaluó de nuevo hasta 5 horas sobre hielo.

Tras la administración del tratamiento (Tabla 24-1) y la estabilización del corazón, el cirujano empezó a cerrar la incisión quirúrgica. Se eliminó el retractor. Los pulmones se hincharon en exceso durante 3 a 4 respiraciones y se inspeccionaron visualmente en la medida de lo posible para garantizar que estuvieran completamente re-hinchados. Esto creó una presión negativa necesaria para prevenir la recuperación posterior de neumotórax. Para evacuar líquido y el exceso de aire de la cavidad torácica después de cerrar la cavidad, se colocó un catéter intravenoso (es decir, 20 de calibre, 2 milímetros de longitud) a través de la piel y las capas de músculo de manera que la punta siguiera en la cavidad torácica. Se tuvo cuidado de manera que la punta no perforara el pulmón o corazón. Las

costillas separadas y el músculo asociado se suturaron juntos con sutura apropiada. Las capas superiores de músculo se suturaron usando un simple patrón continuo. La piel se cerró con seda 4-0 usando un patrón de colchón horizontal. Se unió una jeringa de 10 mililitros al catéter intravenoso que se había colocado previamente en la cavidad torácica y el émbolo se sacó lentamente para extraer líquidos y aire de la cavidad. Al mismo tiempo, el catéter se extrajo lentamente del sitio de entrada, permitiendo así que la masa de músculo de alrededor y la piel sellaran el agujero. Se quitó la gasa quirúrgica y se administraron líquidos (es decir, disolución de Ringer con lactato, 25 mililitros/kilogramo subcutáneamente [SC] o intraperitonealmente [IP]).

Tabla 24-1. Pautas de tratamiento

Nº Gr.	Nº de Machos	Artículo test	Nivel Dosis (células/animal)	Conc. Dosis (cel./mL)	Ruta / Dosis Regimen	Tiempo de administración de tratamiento	Día Necropsia
1	8	Vehículo	0	0	La inyección directa (s) en la región isquémica del ventrículo izquierdo del corazón, que consta de 3 a 10 inyecciones intramiocárdicas de 100 µl en total.	15 minutos después de la ligadura de la arteria coronaria	Día 28 (± 1 Día)
2	8	Umbilical (P10) (B)	1 millón	10 millón			
2	8	Fibroblastos Humanos 1F1853 (P10) (D)					
Gr. = Grupo; Nº = Número; Conc. = Concentración							

Inmediatamente después de que cada rata se hubiera sometido al tratamiento con el artículo de prueba y la incisión se hubiera suturado, el animal se sometió a un examen de ecocardiografía (ECG). La anestesia se mantuvo durante toda la completitud del examen de eco. Tras completarse el examen de eco, la ventilación se interrumpió, y la rata se devolvió al área de recuperación para recuperarse en una jaula de recuperación oxigenada calentada.

Se completó un segundo examen de eco de cada animal superviviente al final del estudio (aproximadamente 28 días después del tratamiento), antes de la terminación. Durante el segundo examen, los animales se anestesiaron como se ha descrito previamente.

Para cada examen de eco, el área torácica izquierda se rasuró, y se calentó, se aplicó gel ultrasónico a la piel para potenciar el contacto con el transductor. Se colocaron almohadillas de electrodo alrededor de las extremidades apropiadas para recibir una señal de ECG. Las imágenes ecocardiográficas incluyeron vistas del eje corto y del eje largo para permitir la determinación de las dimensiones de la cavidad ventricular, contractilidad, circulación sanguínea a través de la vasculatura y espesor de pared. Estas imágenes se guardaron en un disco óptico para análisis adicional. Después del examen, el medio de gel se eliminó de la piel con gasa o toalla de papel. La rata se sacó del respirador y se colocó en una jaula de recuperación calentada hasta que pudo moverse.

Al concluir los procedimientos quirúrgicos, la ventilación respiratoria se apagó. Los animales se observaron para el reflejo pedal. Posteriormente se retiraron la sonda rectal y los electrodos ECG, y el animal se extubó y se colocó en una jaula de recuperación oxigenada calentada. Después de la completa recuperación de la anestesia, a los animales se les administró buprenorfina (0,05 miligramo/kilogramo, SC). Se hicieron observaciones regularmente hasta que los animales mostraron movilidad completa y un interés en comida y agua. A continuación, los animales se colocaron en una jaula de alojamiento limpia y se devolvieron a la sala de alojamiento de animales. Los animales se monitorizaron para la integridad de la incisión quirúrgica dos veces al día después de la cirugía.

Se administraron analgésicos (es decir, nuprenorfina, 0,05 miligramos/kilogramo, SC.) dos veces al día durante 4 días posoperatoriamente y a partir de aquí según fuera necesario. Las indicaciones visuales del dolor posoperatorio incluyen ausencia de posturas del cuerpo normales y movimiento (por ejemplo, el animal sigue en posición encorvada), antipatía, falta de comida/bebida, falta de acicalamiento, y similares.

Se registró el peso corporal para cada animal antes del tratamiento inicial, semanalmente a partir de aquí, y el día de la autopsia. Los animales encontrados muertos se pesaron y se les hizo la autopsia.

Con el fin de recoger el corazón, cada rata se anestesió como se hizo para la cirugía. Se canuló la vena yugular. El corazón se detuvo en diástole con KCl infundido por la cánula yugular. A continuación, el corazón se sacó de la cavidad torácica. Entonces se realizó una autopsia limitada en el corazón después de que el corazón se colocara en 10 % de formalina tamponada neutra. A continuación se desechó el resto de cada cadáver sin evaluación adicional.

Los corazones de todos los animales que se encontraron muertos o que se sacrificaron moribundos se colocaron en 4 % de paraformaldehído hasta que se evaluaron. A continuación se desechó el resto de cada cadáver sin evaluación adicional.

5 **Histología y análisis de imágenes.** Tejidos fijados seccionados con una matriz de corazón coronal de acero inoxidable (Harvard Apparatus, Holliston, MA) dieron cuatro secciones de tejido en serie de dos milímetros de espesor. Las secciones se procesaron y se incorporaron en serie en parafina usando métodos rutinarios. Se obtuvieron secciones de cinco micrómetros por microtomo y se tiñeron con tri-cromo de Masson para tejido
10 conjuntivo (Poly Scientific, Bay Shore, NY) usando los procedimientos del fabricante. Se capturaron fotomicrografías electrónicas y se analizaron usando métodos de análisis de imágenes desarrollados por Phase 3 Imaging System (Glen Mills, PA). Las fotomicrografías de las secciones teñidas con tri-cromo se analizaron colorimétricamente electrónicamente para determinar el área global del ventrículo y la pared libre y el área de la tinción diferencial.

15 **Resultados**

No hubo pérdida en la viabilidad de células durante 5 horas en el vehículo cuando se mantuvo sobre hielo. Las células se inyectaron en el infarto con de uno a tres puntos de entrada de la aguja y múltiples cambios en la dirección de la orientación de la aguja.

20 Se calcularon valores de acortamiento fraccionario como se describe por Sahn et al. (1978) Circulation 58:1072-1083. El acortamiento fraccionario de los animales tratados con vehículo tuvo una disminución significativa del 47,7 % ± 8,3 % en el día 0 al 23,5 % ± 30,2 % en el día 28 (p<0,05). Los animales que se trataron con las células derivadas del cordón umbilical mostraron pequeñas diferencias no significativas entre el acortamiento fraccionario entre el día 0 y 28. No hubo diferencias significativas entre el acortamiento fraccionario entre los grupos de
25 tratamiento en el día 0.

Tras la terminación del estudio, los corazones se recogieron y se sometieron a análisis histológico. Los corazones se detuvieron en diástole y se fijaron. Los resultados se calcularon a partir de un algoritmo para estimar el porcentaje de área del corazón total que comprende el infarto. El tamaño del infarto en los animales tratados con vehículo fue 22,9 % ± 6,7 % del área del corazón, mientras que el tamaño del infarto en corazones tratados con células del
30 cordón umbilical fue 12,5 % ± 2,5 %, con células derivadas de la placenta (aislado 2) fue 12,9 % ± 3,4 % y con fibroblastos fue 19,3 % ± 8,0 %. La diferencia del tamaño del infarto de animales tratados con células con respecto a animales tratados con vehículo no fue estadísticamente significativa basándose en prueba de la t de Student.

35 **Resumen.** Los resultados del presente estudio sugieren que las células derivadas del cordón umbilical tienen algún beneficio en reducir el daño de un infarto de miocardio quirúrgicamente inducido en ratas. Los animales tratados con vehículo mostraron una reducción significativa en la función cardíaca del día 0 al día 28, como se mide por acortamiento fraccionario, mientras que los animales tratados con células derivados del cordón umbilical mostraron un cambio mínimo durante el estudio de 28 días. Los animales tratados con fibroblastos mostraron un cambio
40 mínimo, pero solo dos animales sobrevivieron al estudio. La evaluación del tamaño del infarto sugirió que hay un poco de reducción modesta, pero no estadísticamente significativa, en el tamaño del infarto en los animales tratados con células derivadas del posparto en comparación con los controles de vehículo en el día 28. Tomados conjuntamente, estos datos soportan la eficacia de las células derivadas del cordón umbilical en reducir el daño de un infarto de miocardio.

45 **EJEMPLO 25**

Uso de células derivadas del cordón umbilical en el tratamiento de retinitis pigmentosa

50 Actualmente no existe tratamiento real para trastornos de ceguera que proceden de la degeneración de células en la retina. La pérdida de fotorreceptores como resultado de la apoptosis o degeneración secundaria conduce a deterioro progresivo de la visión y, por último lugar a, ceguera. Las enfermedades en las que esto se produce incluyen degeneración macular senil (AMD) y retinitis pigmentosa (RP). La RP está lo más comúnmente asociada a una mutación de un único gen, que contribuye a la muerte celular de fotorreceptores.

55 Los fotorreceptores retinianos y el epitelio del pigmento retiniano adyacente forman una unidad funcional. La rata del Real Colegio de Cirujanos (RCS) presenta un defecto de cinasa del receptor de tirosina (Merkt) que afecta a la fagocitosis de segmentos externos, que conducen a la muerte celular de fotorreceptores (1). Se encontró que el trasplante de células epiteliales del pigmento retiniano (RPE) en el espacio subretiniano de ratas RCS limitaba el
60 progreso de la pérdida de fotorreceptores y preservaba la función visual (2). En este ejemplo se demuestra que las células derivadas del cordón umbilical pueden usarse para promover el rescate de fotorreceptores en un modelo de RCS.

65 **Métodos y materiales**

Trasplantes de células. Se expandieron cultivos de células umbilicales y de fibroblasto adultas humanas (pase 10)

durante 1 pase. Todas las células se sembraron inicialmente a 5.000 células/cm² en matraces T75 recubiertos de gelatina en medio de crecimiento. Para los pases posteriores, todas las células se trataron del siguiente modo: después de la tripsinación, las células viables se contaron después de la tinción con azul de tripano. Brevemente, se combinaron 50 microlitros de suspensión de células con 50 microlitros de 0,04 % peso/volumen de azul de tripano (Sigma, St. Louis MO) y el número de células viables se estimó usando un hemocitómetro. Las células se tripsinaron y se lavaron tres veces en medio DMEM:bajo en glucosa libre de enriquecimiento (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los cultivos de células umbilicales y de fibroblasto humanas en el pase 11 se tripsinaron y se lavaron dos veces en medio L-15 de Leibovitz (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Para el procedimiento de trasplante, ratas distróficas RCS se anestesiaron con xilazina-ketamina (1 miligramo/kilogramo i.p. de la siguiente mezcla: 2,5 mililitros de xilazina a 20 miligramos/mililitro, 5 mililitros de ketamina a 100 miligramos/mililitro y 0,5 mililitros de agua destilada) y sus cabezas se aseguraron por una barra nasal. Las células que carecían de suero se resuspendieron (2×10^5 células por inyección) en 2 microlitros de medio L-15 de Leibovitz (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se trasplantaron usando una pipeta de vidrio fino (diámetro interno 75-150 micrómetros) trans-esceralmente.

Las células se administraron en el espacio subretiniano dorso-temporal de ratas RCS pigmentadas distróficas de 3 semanas de edad anestesiadas (total N=10/tipo de célula). Las células se inyectaron unilateralmente en el ojo derecho, mientras que el ojo izquierdo se inyectó con medio de vehículo solo (control vacío; medio L-15 de Leibovitz). La viabilidad de células de trasplante residuales siguió a más del 95 % como se evalúa por exclusión con azul de tripano al final de la sesión de trasplante. Después de realizarse inyecciones de células, los animales se inyectaron con dexametasona (2 miligramo/kilogramo) durante 10 días después del trasplante. Durante la duración del estudio, los animales se mantuvieron con ciclosporina A oral (210 miligramos/litro de agua potable; concentración en sangre resultante: 250-300 microgramos/litro) (Bedford Labs, Bedford, Ohio) desde 2 días antes del trasplante hasta el fin del estudio. Estuvieron disponibles comida y agua a voluntad. Los animales se sacrificaron 60 o 90 días posoperatoriamente, sacrificándose algunos animales en momentos de tiempo anteriores para la evaluación histológica de cambios a corto plazo asociados al trasplante de células.

Registros de ERG. Tras la adaptación a la oscuridad durante la noche, los animales se prepararon para registros de ERG bajo luz roja tenue, como se describe previamente (3). En resumen, bajo anestesia (con una mezcla de 150 miligramos/kilogramo i.p. de ketamina, y 10 miligramos/kilogramo i.p. de xilazina), la cabeza del animal se aseguró con un soporte para la cabeza estereotáctico y la temperatura del cuerpo se monitorizó mediante un termómetro rectal y se mantuvo a 38 °C usando una manta homeotérmica. Se dilataron las pupilas usando partes iguales de 2,5 % de fenilefrina y 1 % de tropicamida tópicas. Se usó anestesia tópica con 0,75 % de bupivacaína para prevenir cualquier reflejo de la córnea y frecuentemente se aplicó una gota de 0,9 % de solución salina sobre la córnea para prevenir su deshidratación y permitir el contacto eléctrico con el electrodo de registro (bucle de hilo de oro). Una aguja de calibre 25 insertada bajo el cuero cabelludo, entre los dos ojos, sirvió de electrodo de referencia. La amplificación (a 1-1.000 Hz de paso banda, sin filtrado activo), presentación de estímulos y la adquisición de datos se proporcionaron por el sistema UTAS-3000 de LKC Technologies (Gaithersburg, MD). Los ERG se registraron a los 60 y 90 días de edad en los grupos de células umbilicales y a los 60 días solo en los grupos de fibroblastos.

Registro de ondas a y b mixtas. Para la cuantificación de ondas b adaptadas a la oscuridad, los registros consistieron en presentaciones de un único destello (duración de 10 microsegundos), repetidas 3 a 5 veces para verificar la fiabilidad de la respuesta y mejorar la relación de señal con respecto a ruido, si se requiere. Los estímulos estuvieron presentes a seis intensidades crecientes en etapas de unidades logarítmicas que varían de -3,6 a 1,4 candelas/m² logarítmicas de luminancia. Para minimizar el posible blanqueamiento de bastones, los intervalos entre estímulos aumentaron a medida que la luminancia del estímulo aumentó de 10 segundos a la menor intensidad de estímulo a 2 minutos a la mayor intensidad de estímulo. La máxima amplitud de onda b se definió como la obtenida a partir de las series de intensidad de destellos, independientemente de la intensidad del estímulo. No se usó la $V_{máx}$ real del ajuste de los datos con una curva de Naka-Rushton debido a que las respuestas ERG fueron frecuentemente erráticas a los mayores niveles de luminancia en animales distróficos y mostraron tendencias para respuestas débiles de aproximadamente 0,4 y 1,4 candelas/m² logarítmicas. Con el fin de determinar la edad a la que los componentes ERG se obtuvieron o perdieron, se usaron las amplitudes criterio: 20 microvoltios para ondas a y b, y 10 microvoltios para respuestas similares a STR. La amplitud de la onda b se midió a partir del pico negativo de la onda a hasta la punta positiva de la onda b, y no hasta el pico de oscilaciones, que puede superar la punta de la onda b (4).

Aislamiento de respuestas de bastones y conos. Se usó el protocolo de destellos doble para determinar el aislamiento de respuestas de bastones y conos (5). Se presentó un destello de sonda 1 segundo después de un destello de acondicionamiento, usando una característica específica del sistema UTAS-3000 (LKC Technologies) con Ganzfeld calibrado; asegurando la recarga completa del estimulante en las condiciones usadas. La función del destello de acondicionamiento en el procedimiento fue para saturar transitoriamente bastones de manera que se volvieran insensibles al destello de la sonda. Se tomó que la respuesta al destello de la sonda reflejaba la actividad conducida por conos. Se obtuvo una onda b conducida por conos restando la respuesta conducida por conos de la respuesta mixta (obtenida siguiendo la presentación de un destello de sonda solo, es decir, no precedido por ningún destello de acondicionamiento).

Evaluación funcional. Se realizó una prueba de la sensibilidad retiniana fisiológica para demostrar la respuesta retiniana a luz tenue. Los animales se anestesiaron con una dosis de recuperación de uretano a 1,25 gramos/kilogramo i.p. La evaluación fisiológica en los animales se probó después del injerto en animales a los 90 días registrando la actividad extracelular multiunitaria en el colículo superior a la iluminación de campos receptivos visuales respectivos (6). Este procedimiento se repitió durante 20 puntos independientes (separados 200 milímetros, correspondiéndose cada etapa a aproximadamente 10-150 desplazamientos en el campo visual), cubriendo el campo visual. Se midieron los umbrales visuales como el aumento en la intensidad con respecto al fondo y se mantuvieron a 0,02 candelas/m² (unidad de luminiscencia) [al menos 2,6 unidades logarítmicas por debajo de la saturación de bastones (7)], requerida para activar unidades en los 200 micrómetros superficiales del colículo superior con una macha de luz 3° en el diámetro. Los parámetros de respuesta se compararon entre ojos de control trasplantados y de control que recibieron el vehículo solo.

Histología. Los animales se sacrificaron con una sobredosis de uretano (12,5 gramos/kilogramo). La orientación del ojo se mantuvo colocando una sutura 6,0 a través del músculo recto superior antes de la enucleación. Después de hacer una incisión de la córnea, los ojos se fijaron con 2,5 % de paraformaldehído, 2,5 % de glutaraldehído, 0,01 % de ácido pícrico en tampón cacodilato 0,1 M (pH 7,4). Después de la fijación, la córnea y el cristalino se extrajeron cortando alrededor del cuerpo ciliar. Se hizo un pequeño corte en la periferia de la retina dorsal antes de la extracción del recto superior para ayudar en el mantenimiento de la orientación. A continuación, las retinas se fijaron posteriormente en 1 % de tetróxido de osmio durante 1 hora. Después de la deshidratación mediante una serie de alcoholes hasta epoxipropano, las retinas se incorporaron en resina de incorporación TAAB (TAAB Laboratories, Alderminster, RU). Se tiñeron secciones semi-delgadas con 1 % de azul de toluidina en 1 % de tampón borato y las secciones ultra-finas se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo.

Para tinción de Nissl, se tiñeron secciones con 0,75 % de violeta de cresilo (Sigma, St. Louis, MO) después de que se deshidrataran mediante alcoholes graduados al 70, 95 y 100 % dos veces, se dispusieron en xileno (Sigma, St. Louis, MO), se aclararon con PBS (pH 7,4) (Invitrogen, Carlsbad, CA), se pusieron en cubreobjetos y se montaron con montante DPX (Sigma, St. Louis, MO).

Resultados

Registros de ERG. Los animales que recibieron inyecciones de células derivadas del cordón umbilical presentaron preservación relativa de las propiedades de respuesta visual 60 y 90 días posoperatoriamente (Tabla 25-1). La respuesta observada en estos animales fue superior a la observada con animales tratados con fibroblastos o con control.

Animales trasplantados con células derivadas del cordón umbilical (n=6) demostraron una buena mejora en todas las medidas de resultados probadas a los 60 días (Tabla 25-1), onda a (27 ± 11) frente a controles (0), onda b mixta (117 ± 67) frente a controles (18 ± 13), onda b de conos (55 ± 25) frente a controles (28 ± 11) y en la contribución de bastones (49 ± 16 %) frente a controles (6 ± 7 %). Además, a los 90 días, se midieron respuestas mejoradas en dos animales probados, con medidas que incluyeron: onda a (15 ± 7) frente a controles (0), onda b mixta (37 ± 15) frente a controles (0), onda b de conos (16 ± 11) frente a controles (7 ± 5) y en la contribución de bastones (58 ± 39 %) frente a controles (0 %). Estos resultados indican que la sensibilidad visual mejoró en animales trasplantados con células derivadas del cordón umbilical con evidencia del rescate de fotorreceptores. Aunque se observó una disminución en la sensibilidad a ERG en los animales de 90 días probados, fue buena su preservación de función visual en comparación con controles tratados.

A diferencia de las células derivadas del cordón umbilical, los trasplantes de fibroblastos no mostraron mejora en ninguno de los parámetros probados.

Tabla 25-1: Datos de ERG

Grupo	Onda-a		Onda-b mezclada		Onda-b cónica		% contribución barra	
	Sin tratar	Tratado	Sin tratar	Tratado	Sin tratar	Tratado	Sin tratar	Tratado
Sham 60d	0	0	7 ± 9	0	23 ± 5	12 ± 16	N/A	N/A
U (n=6) 60d	0	27 ± 11	18 ± 13	117 ± 67	28 ± 11	55 ± 25	6 ± 7	49 ± 16
U (n=6) 90d	0	15 ± 7	0	37 ± 15	7 ± 5	16 ± 11	0	58 ± 39

N.B. Sham = control (medio solo), U = Trasplante de células derivadas del ombligo

Histología. Tras el trasplante, no hubo evidencia histológica de una reacción inflamatoria y no se observaron células inmunitarias infiltrantes en secciones teñidas con Nissl en los grupos de células posparto. Sin embargo, implantaciones de fibroblastos produjeron la muerte de animales (n=7) e indicaciones de respuestas inflamatorias de etapa temprana. Histológicamente, en el momento de tiempo de 90 días, en los animales trasplantados con células derivadas del cordón umbilical se demostró claramente el rescate anatómico de fotorreceptores. Los fotorreceptores formaron una gruesa capa separada por un hueco de la capa nuclear interna, constituida de otras células retinianas. Por comparación, la anchura de la capa externa en el control fue, en el mejor de los casos, una única capa discontinua a diferencia de aproximadamente 5 células de espesor en el ojo injertado. En comparación con un animal normal, esto es marginalmente superior a la mitad del espesor de capas de células fotorreceptoras normalmente observadas.

Evaluación funcional. Se monitorizó la eficacia de los trasplantes en prevenir la pérdida visual por evaluación de la sensibilidad electrofisiológica en dos animales. Se usó la respuesta de sensibilidad umbral a la luz para definir el área de rescate del campo visual en ojos de control inyectados con control frente a ojos trasplantados con las células derivadas del cordón umbilical. En ratas no distróficas, los umbrales visuales nunca superaron 0,5 candelas/m² logarítmicas por encima del fondo. En ratas distróficas no operadas, los umbrales están normalmente en la magnitud de 4 unidades logarítmicas en candelas/m² (8). Por el contrario, en ratas distróficas no operadas inyectadas con control, los umbrales estuvieron en el orden de 2,9 -4,9 unidades logarítmicas en candelas/m² con un umbral promedio de 4,0 unidades logarítmicas en candelas/m², en algunos casos no podría obtenerse registro. Así, las ratas inyectadas con control mostraron algún rescate funcional altamente localizado en la retina temporal. Sin embargo, las ratas trasplantadas con células derivadas del cordón umbilical humano presentaron niveles sustancialmente mayores de preservación visual con umbrales que oscilan de 0,8 a 2,1 unidades logarítmicas en candelas/m², con un umbral promedio de 1,3 unidades logarítmicas en candelas/m².

Resumen. El trasplante de las células derivadas del cordón umbilical en ratas RCS distróficas pueden preservar los fotorreceptores. En este modelo degenerativo cabría esperar que la onda a desapareciera dentro de 30 a 60 días y la onda b desapareciera dentro de 3 meses. Así, la onda a básicamente retenida indica que se preserva la función de bastones real y normal. La contribución de bastones a la onda b sugiere que la función de bastones anormal es todavía posible. La onda b no de bastones sostenida es la medida de cómo la función de conos se mantiene, que es una medida real de visión. Así, el nivel de mejora evaluado tanto fisiológica como anatómicamente tras el trasplante de células derivadas del cordón umbilical se define bien aquí. Las mediciones de ERG proporcionan una evaluación de la función visual después de la pérdida de fotorreceptores, que indica cambios en la actividad eléctrica en la retina. Sin embargo, el ERG no proporciona información directa en cuanto a la capacidad de formación de imágenes. La medición de la sensibilidad umbral colicular usada en este estudio proporciona una indicación de preservación relativa de campos visuales. La importancia de esta medida se basa en una correlación entre las cantidades de rescate funcional y preservación anatómica y que los datos recogidos compara con las pruebas de perimetría del campo visual en seres humanos (9). El trasplante ha demostrado un retardo del proceso de enfermedad en los animales de prueba. Así, los resultados presentados en el presente documento demuestran una clara evidencia de la eficacia funcional del injerto de células derivadas del cordón umbilical humano en el espacio subretiniano, y que la preservación de fotorreceptores se produce en la región general en la que se localizan las células injertadas.

Referencias para el Ejemplo 25

1. D'Cruz PM, Yasumura D, Weir J, Matthes MT, Abderrahim H, LaVail MM, Vollrath D. Mutation of the receptor tyrosine kinase gene *Mertk* in the retinal dystrophic RCS rat. *Hum Mol Genet.* 2000 Mar 1;9(4):645-51.
2. Li LX, Turner JE. Inherited retinal dystrophy in the RCS rat: prevention of photoreceptor degeneration by pigment epithelial cell transplantation. *Exp Eye Res.* 1988 Dec;47(6):911-7.
3. Sauve Y, Lu B and Lund RD. The relationship between full field electroretinogram and perimetry-like visual thresholds in RCS rats during photoreceptor degeneration and rescue by cell transplants. *Vision Res.* 2004 Jan;44(1):9-18.
4. Nusinowitz, S., Ridder, WH 3rd, and Heckonlively, HR. Rod multifocal electroretinograms in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999 Nov;40(12):2848-58.
5. Nixon, PJ, Bui, PV, Armitage, JA, and Vingrys AJ. The contribution of cone responses to rat electroretinograms. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2001 Jun;29(3):193-6.
6. Lund RD, Adamson P, Sauve Y, Keegan DJ, Girman SV, Wang S, Winton H, Kanuga N, Kwan AS, Beauchene L, Zerbib A, Hetherington L, Couraud PO, Coffey P, Greenwood J. Subretinal transplantation of genetically modified human cell lines attenuates loss of visual function in dystrophic rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Aug 14;98(17):9942-7.
7. Siminoff R, Kruger L. Properties of reptilian cutaneous mechanoreceptors. *Exp Neurol.* 1968 Mar;20(3):403-14.
8. Blakemore, G.W. and Dräger, U.C. 1991. *Visual Neuroscience.* 6:577-585.
9. Beck RW, Bergstrom TJ, Lichter PR. A clinical comparison of visual field testing with a new automated perimeter, the Humphrey Field Analyzer, and the Goldmann perimeter. *Ophthalmology.* 1985 Jan;92(1):77-82.

EJEMPLO 26**Potencial condrogénico de células derivadas del posparto en la implantación en ratones SCID**

- 5 Se evaluó el potencial condrogénico de células derivadas de cordón umbilical o tejido de placenta tras la siembra sobre andamiajes cargados con factor de crecimiento biorresorbibles e implantación en ratones SCID.

Materiales y métodos

- 10 **Reactivos.** Se obtuvieron medio esencial modificado por Dulbecco (DMEM), penicilina y estreptomycin de Invitrogen, Carlsbad, CA. Se obtuvo suero de ternero fetal (FCS) de HyClone (Logan, UT). Se obtuvieron medio de crecimiento de citoblastos mesenquimatosos (MSCGM) de Biowhittaker, Walkersville, MD. TGFbeta-3 se obtuvo de Oncogene Research Products, San Diego, CA. rhGDF-5 se obtuvo de Biopharm, Heidelberg, Alemania (publicación PCT internacional N° WO96/01316 A1, patente de EE.UU. N° 5.994.094A). El medio de crecimiento de condrocitos comprendió DMEM-alto en glucosa enriquecido con 10 % de suero de ternero fetal (FCS), HEPES 10 milimolar, aminoácidos no esenciales 0,1 milimolar, 20 microgramos/mililitro de L-prolina, 50 microgramos/mililitro de ácido ascórbico, 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomycin y 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina B. Se obtuvo fibrinógeno bovino de Calbiochem.

- 20 **Células.** Se obtuvieron citoblastos mesenquimatosos humanos (hMSC, lote n° 2F1656) de Biowhittaker, Walkersville, MD, y se cultivaron en MSCGM según las instrucciones del fabricante. Este lote se probó en el laboratorio previamente en experimentos *in vitro* y se mostró que era positivo en los ensayos de condrogénesis. Se obtuvieron fibroblastos adultos humanos de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA) y se cultivaron en medio de crecimiento en matraces de plástico de cultivo de tejido recubiertos de gelatina. Se prepararon células derivadas del posparto aisladas de cordones umbilicales humanos (lote n° 022703Umb) y placenta (lote n° 071003Plac) como se ha descrito previamente (Ejemplo 1). Las células se cultivaron en medio de crecimiento en matraces de plástico de cultivo de tejido recubiertos de gelatina. Los cultivos celulares se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂. Las células usadas para los experimentos estuvieron en los pases 5 ("pase bajo") y 14 ("pase alto").

- 30 **Andamiajes.** Se formaron espumas compuestas de 35/65 de copolímero de poli(épsilon-caprolactona)(PCL)/poli(ácido glicólico) (PGA) (35/65 de PCL/PGA), reforzadas con malla de polidioxanona (PDS) (espuma de PGA/PCL-malla de PDS) por el proceso de liofilización, como se describe en la patente de EE.UU. N° 6.355.699. Las espumas tuvieron 4 cm x 5 cm, y 1 mm de espesor. Las espumas se esterilizaron mediante tratamiento con óxido de etileno (ETO). Se cargaron perforaciones (3,5 milímetros) hechas de andamiajes con tanto rhGDF-5 (3,4 microgramos/andamiaje), TGFbeta-3 (10 nanogramos/andamiaje), una combinación de rhGDF-5 como TGFbeta-3, o medio de control, y se liofilizaron.

- 40 **Siembra de células sobre andamiajes.** Se trataron células derivadas de placenta y del cordón umbilical con tripsina, y se determinó el número de células y la viabilidad. Se resuspendieron $7,5 \times 10^5$ células en 15 microlitros de medio de crecimiento y se sembraron sobre perforaciones de andamiaje de 3,5 milímetros en una placa de cultivo celular. El andamiaje sembrado con células se incubó en una estufa de incubación de cultivo celular (37 °C, 5 % de CO₂) durante 2 horas, después de lo cual se colocaron dentro de anillos de explante de cartílago.

- 45 **Explantos de cartílago bovino.** Se prepararon explantes de cartílago de 5 milímetros de diámetro a partir de cartílago obtenido de paleta bovina joven. Se escindieron perforaciones (3 milímetros) del centro del explante y se sustituyeron con células sembradas en andamiaje resorbible de 3,5 milímetros. Los andamiajes con células se retuvieron dentro de los explantes usando pegamento de fibrina (60 microlitros de fibrinógeno bovino, 3 miligramos/mililitro). Las muestras se mantuvieron en medio de crecimiento de condrocitos durante la noche, se aclararon en solución salina tamponada con fosfato al día siguiente y se implantaron en ratones SCID.

- 50 **Animales.** Se obtuvieron ratones SCID (*Mus musculus*)/Fox Chase SCID/macho), 5 semanas de edad, de Harlan Sprague Dawley, Inc. (Indianápolis, Indiana) y Charles River Laboratories (Portage, Michigan). Los animales usados en el estudio se seleccionaron sin ningún sesgo sistemático evidente. Se colocó una etiqueta sobre cada jaula de animal individual que enumeraba el número de acceso, técnica de implantación, número de animal, especie/raza, fecha de cirugía, periodo *in vivo* y fecha de la eutanasia. Los animales se identificaron por números secuenciales marcados en la oreja con un rotulador de tinta indeleble.

- 60 **Diseño experimental.** Se probaron un total de 42 ratones. Se implantaron dos andamiajes subcutáneamente en cada ratón como se describe más adelante; 42 ratones para implantación subcutánea; 28 tratamientos con valor n de 3 por tratamiento. El estudio se corresponde con el número de autorización de la IACUC: Skillman IACUC 01-037. El estudio duró seis semanas.

Implantación de SCID.

- 65 **A. Pesos corporales**

Cada animal se pesó antes de anestesiarse y en la autopsia.

B. Anestesia y preparación quirúrgica:

5 Toda la manipulación de los ratones SCID se produjo bajo una campana. Los ratones se pesaron individualmente y se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de una mezcla de KETASET® (clorhidrato de ketamina [60 miligramos/kilogramo]), ROMPUN® (xilazina [10 miligramos/kilogramo]), y solución salina.

10 Después de la inducción de anestesia, el lomo entero del animal desde el área cervical dorsal hasta el área lumbosacra dorsal se cortó sin pelo usando tijeras para animales eléctricas. El área se lavó con diacetato de clorhexidina, se aclaró con alcohol, se secó y se pintó con una disolución de yodóforo acuosa de 1 % de yodo disponible. Se aplicó pomada oftálmica a los ojos para prevenir el secado del tejido durante el periodo anestésico. El animal anestesiado y quirúrgicamente preparado se colocó en la posición decúbito deseada.

15 *C. Técnica de implantación subcutánea:*

Se hizo una incisión de la piel de aproximadamente 2 centímetros justamente lateral a la columna vertebral torácica paralela a la columna vertebral. La piel se separó del tejido conjuntivo subyacente mediante disección roma. Cada ratón SCID recibió 2 tratamientos que se colocaron en bolsillos subcutáneos creados por disección roma en cada hemitórax mediante una incisión en la piel (Tabla 26-1). Se usaron suturas adhesivas de 5-0 ETHIBOND EXCEL (poliéster) (Ethicon Inc, Somerville, NJ) para adherir la piel a la musculatura alrededor de cada andamiaje para prevenir la migración subcutánea. Los andamiajes se implantaron durante 6 semanas y a continuación se recogieron. El diseño experimental se expone brevemente en la Tabla 26-1.

25 **Tabla 26-1. Diseño experimental: Tratamiento (N=3 por tratamiento)**

- 30 A. Espuma de 65/35 de PGA/PCL + Malla de PDS cultivada con células derivadas de la placenta, EP, TGFb3
 B. Espuma de 65/35 de PGA/PCL + Malla de PDS cultivada con células derivadas de la placenta, EP, rhGDF-5
 C. Espuma de 65/35 de PGA/PCL + Malla de PDS cultivada con células derivadas de la placenta, EP, rhGDF-5+TGFb3
 D. Espuma de 65/35 de PGA/PCL + Malla de PDS cultivada con células derivadas de la placenta, EP, control
 E. Espuma de 65/35 de PGA/PCL + Malla de PDS cultivada con células derivadas de la placenta, LP, TGFb3
 F. Espuma de 65/35 de PGA/PCL + Malla de PDS cultivada con células derivadas de la placenta, LP, rhGDF-5
 35 G. Espuma de 65/35 de PGA/PCL + Malla de PDS cultivada con células derivadas de la placenta, LP, rhGDF-5+TGFb3
 H. Espuma de 65/35 de PGA/PCL + Malla de PDS cultivada con células derivadas de la placenta, LP, control
 I. Espuma de 65/35 de PGA/PCL + Malla de PDS cultivada con células derivadas del cordón umbilical, EP, TGFb3
 J. Espuma de 65/35 de PGA/PCL + Malla de PDS cultivada con células derivadas del cordón umbilical, EP, rhGDF-5
 40 K. Espuma de 65/35 de PGA/PCL + Malla de PDS cultivada con células derivadas del cordón umbilical, EP, rhGDF-5+TGFb3
 L. Espuma de 65/35 de PGA/PCL + Malla de PDS cultivada con células derivadas del cordón umbilical, EP, control
 M. Espuma de 65/35 de PGA/PCL + Malla de PDS cultivada con células derivadas del cordón umbilical, LP, TGFb3
 N. Espuma de 65/35 de PGA/PCL + Malla de PDS cultivada con células derivadas del cordón umbilical, LP, rhGDF-5
 45 O. Espuma de 65/35 de PGA/PCL + Malla de PDS cultivada con células derivadas del cordón umbilical, LP, rhGDF-5+TGFb3
 P. Espuma de 65/35 de PGA/PCL + Malla de PDS cultivada con células derivadas del cordón umbilical, LP, control
 Q. Espuma de 65/35 de PGA/PCL + Malla de PDS cultivada con hMSC, TGFb3
 R. Espuma de 65/35 de PGA/PCL + Malla de PDS cultivada con hMSC, rhGDF-5
 50 S. Espuma de 65/35 de PGA/PCL + Malla de PDS cultivada con hMSC, rhGDF-5+TGFb3
 T. Espuma de 65/35 de PGA/PCL + Malla de PDS cultivada con hMSC, control
 U. Espuma de 65/35 de PGA/PCL + Malla de PDS cultivada con fibroblastos, TGFb3 de adulto
 V. Espuma de 65/35 de PGA/PCL + Malla de PDS cultivada con fibroblastos, rhGDF-5 de adulto
 W. Espuma de 65/35 de PGA/PCL + Malla de PDS cultivada con fibroblastos, rhGDF-5 de adulto + TGFb3
 55 X. Espuma de 65/35 de PGA/PCL + Malla de PDS cultivada con fibroblastos, control de adulto
 Y. Espuma de 65/35 de PGA/PCL + Malla de PDS, TGFb3
 Z. Espuma de 65/35 de PGA/PCL + Malla de PDS, rhGDF-5
 AA. Espuma de 65/35 de PGA/PCL + Malla de PDS, rhGDF-5+TGFb3
 60 BB. Espuma de 65/35 de PGA/PCL + Malla de PDS, control

D. Autopsia y preparación histológica

Se realizó un examen macroscópico en cualquier animal que murió durante el transcurso del estudio o se sacrificó en condición moribunda. Se guardaron tejidos seleccionados a criterio del director del estudio y/o patólogo.

65 Se sacrificaron ratones por inhalación de CO₂ a sus intervalos designados. Se registraron observaciones

macroscópicas de los sitios implantados. Se escindieron muestras de los sitios de implantación subcutánea con su piel de recubrimiento y se escindieron y se fijaron en 10 % de formalina tamponada. Cada implante se cortó en mitades, y una mitad se envió a MPI Research (Mattawan, MI) para la incorporación en parafina, seccionamiento y tinción con hematoxilina y eosina (H&E) y Safranin O (SO).

Resultados

Se observó la formación de nuevo cartílago y hueso en la mayoría de las muestras que incluyen andamiajes cargados con factor de crecimiento, sembrados con células, andamiajes de control sembrados con células y andamiajes cargados con factor de crecimiento solo. El grado de formación de nuevo cartílago y hueso varió dentro de los grupos de tratamiento y de control.

Andamiajes sembrados con células derivadas de la placenta de pase temprano y tardío mostraron formación de nuevo cartílago y hueso dentro de los andamiajes. No se observaron diferencias obvias en la formación de nuevo cartílago y hueso entre los diferentes andamiajes sembrados con células cargados con factor de crecimiento y andamiajes sembrados con células solo. En comparación con los andamiajes de control (sin factores de crecimiento y sin células), pareció que hubo mayor grado de formación de nuevo cartílago en andamiajes sembrados con células tanto con como sin factores de crecimiento y en andamiajes cargados con factor de crecimiento solo. La formación de nuevo cartílago con andamiajes sembrados con células derivadas de la placenta fue similar a la de los andamiajes sembrados con MSC y fibroblastos.

En los andamiajes tratados con factor de crecimiento y de control sembrados con las células derivadas del cordón umbilical a pase temprano y tardío se observaron formación de nuevo cartílago y hueso. Pareció que el grado de formación de cartílago era inferior al observado con células derivadas de la placenta. Ninguna muestra mostró una amplia formación de cartílago como se observa con las células derivadas de la placenta. Pareció que la formación de hueso era mayor en andamiajes sembrados con las células derivadas del cordón umbilical sobre andamiajes que contenían tanto TGFbeta-3 como rhGDF-5.

Los andamiajes cargados con hMSC también mostraron formación de nuevo cartílago y hueso. El grado de formación de nuevo cartílago y hueso fue similar para todos los grupos de tratamiento de hMSC. Los andamiajes sembrados con fibroblastos adultos humanos también demostraron la formación de nuevo cartílago y hueso. Los resultados fueron similares a aquellos obtenidos con células derivadas de la placenta y hMSC.

En el grupo de control, en el que andamiajes cargados con factor de crecimiento o andamiaje solo se colocaron en anillos de cartílago y se implantaron, también se observaron formación de nuevo cartílago y hueso. No sorprendentemente, el grado de formación de nuevo cartílago fue mayor en andamiajes con factor de crecimiento que en andamiajes sin factor de crecimiento. La elevada formación de hueso estuvo presente en el control con la combinación de los dos factores de crecimiento probados.

Se observó formación de nuevo cartílago adyacente a los anillos de explante de cartílago, además de dentro de los andamiajes. La formación de nuevo cartílago dentro de los andamiajes adyacentes a los anillos de cartílago podría ser un resultado de la migración de condrocitos. La formación de cartílago observada como islas dentro de los andamiajes puede ser un resultado de tanto la migración de condrocitos dentro de los andamiajes, diferenciación de células sembradas como diferenciación de células progenitoras de ratón endógenas. Esta observación procede del hecho de que en los andamiajes cargados con factor de crecimiento de control sin células sembradas se observaron islas de diferenciación condrogénica. Se observó la formación de nuevo hueso dentro de los andamiajes independientemente y también asociado a condrocitos. La formación de hueso puede haber surgido de la diferenciación de osteoblastos, además de la osificación endocondral.

Es difícil de separar la formación de nuevo cartílago y hueso asociada a condrocitos que migraron frente a la de cualquier diferenciación condrogénica y osteogénica de células sembradas que puede haber ocurrido. La tinción de secciones con anticuerpos humanos específicos puede distinguir la contribución de las células sembradas a la condrogénesis y osteogénesis observada. También es posible que las células derivadas de la placenta y las células derivadas del cordón umbilical estimularan la migración de condrocitos.

Se observaron abundantes vasos sanguíneos nuevos con los andamiajes cargados con células derivadas de la placenta y células derivadas del cordón umbilical. Los vasos sanguíneos fueron abundantes en áreas de formación de hueso. También se observaron nuevos vasos sanguíneos dentro de los andamiajes sembrados con hMSC y fibroblastos asociados a la formación de nuevo hueso.

No pueden descargarse efectos sistémicos del andamiaje adyacente (con factor de crecimiento (GF)) sobre los andamiajes de control (sin GF, sin células) sobre la promoción de la formación de nuevo cartílago y hueso. El análisis de la formación de nuevo cartílago y hueso en andamiajes, teniendo en cuenta los andamiajes implantados adyacentes a él en ratones SCID, no mostró un claro patrón del efecto sistémico del factor de crecimiento del andamiaje adyacente.

Resumen. Los resultados mostraron que la formación de nuevo cartílago y hueso se observó en andamiajes de factor de crecimiento y de control sembrados con células derivadas de placenta y del cordón umbilical. Los resultados con células derivadas de la placenta fueron similares a aquellos observados con citoblastos mesenquimatosos humanos, mientras que el grado de formación de nuevo tejido similar a cartílago fue ligeramente menos pronunciado en las células derivadas del cordón umbilical. Los andamiajes cargados con factor de crecimiento implantados sin células también demostraron la formación de nuevo cartílago y hueso. Estos datos indican que la formación de nuevo cartílago dentro de los andamiajes puede surgir de condrocitos que migraron de los explantes bovinos, de diferenciación condrogénica de células progenitoras endógenas y de la diferenciación condrogénica de células sembradas.

Estos resultados sugieren que las células derivadas de placenta y del cordón umbilical experimentan diferenciación condrogénica y osteogénica. Estos resultados también sugieren que las células derivadas de placenta y del cordón umbilical pueden promover la migración de condrocitos del explante de cartílago en los andamiajes. También se observaron abundantes vasos sanguíneos nuevos en los andamiajes especialmente asociados a la formación de nuevo hueso.

Depósito biológico de células derivadas del cordón umbilical y cultivos

De acuerdo con la descripción detallada y los ejemplos escritos proporcionados en el presente documento, ejemplos de células derivadas del cordón umbilical de la invención se depositaron en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA) el 10 de junio de, 2004, y se les asignaron los siguientes números de acceso ATCC: (1) a la designación de cepa UMB 022803 (P7) se le asignó el nº de acceso PTA-6067; y (2) la designación de cepa UMB 022803 (P17) se le asignó el nº de acceso PTA-6068.

Aunque la presente invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencia a las realizaciones actualmente preferidas, se entiende que la invención no se limita a las realizaciones específicamente desveladas y ejemplificadas en el presente documento.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ETHICON, INCORPORATED
 Mistry, Sanjay
 Kihm, Anthony J.
 Harris, Ian Ross
 Harmon, Alexander M.
 Messina, Darin J.
 Seyda, Agnieszka
 Yi, Chin-Feng
 Gosiewska, Anna

<120> CÉLULAS POSPARTO DERIVADAS DE TEJIDO DEL CORDÓN UMBILICAL, Y MÉTODOS DE FABRICACIÓN Y UTILIZANDO EL MISMO

<130> CBAT-0013

<150> US 60/483,264
 <151> 2003-06-27

<160> 16

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 1
 gagaaatcca aagagcaaat gg 22

<210> 2
 <211> 21
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 5 <400> 2
 agaatggaaa actggaatag g 21
 <210> 3
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Construcción sintética
 <400> 3
 tcttcgatgc ttcggattcc 20
 <210> 4
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> Construcción sintética
 <400> 4
 30 gaattctcgg aatctctgtt g 21
 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 5
 40 ttacaagcag tgcagaaaac c 21
 <210> 6
 <211> 22
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 6
 50 agtaaacatt gaaaccacag cc 22
 <210> 7
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 60 <400> 7
 tctgcagctc tgtgtgaagg 20
 <210> 8
 65 <211> 22
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 5 <400> 8
 ctcaaaaac ttctccaca cc 22
 <210> 9
 10 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Construcción sintética
 <400> 9
 cccacgccac gctctc 17
 <210> 10
 20 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> Construcción sintética
 <400> 10
 30 tcctgtcagt tgggtctc 19
 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 11
 40 ctggattggc gttggttg 20
 <210> 12
 <211> 21
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 12
 50 tccaagggtg gtagtctgta g 21
 <210> 13
 <211> 21
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 60 <400> 13
 ctggtgcgca catccctgcc c 21
 <210> 14
 65 <211> 22
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 5
 <400> 14
 ggcagtctgg cttctcaga tt 22
 <210> 15
 10 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Construcción sintética
 <400> 15
 ccctctccct tacccttagc a 21
 20 <210> 16
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 16 23
 30 ctgtgaaagg acctgtctgt cgc 23
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

Reivindicaciones

1. Una célula aislada obtenible de tejido del cordón umbilical humano, en la que dicho tejido del cordón umbilical humano está sustancialmente libre de sangre, dicha célula es capaz de auto-renovación y expansión en cultivo y tiene el potencial de diferenciarse en células de otros fenotipos, dicha célula es capaz de expandirse en presencia de oxígeno de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 20 %, dicha célula requiere L-valina para el crecimiento, y en la que dicha célula tiene las siguientes características:
- a. potencial de experimentar al menos 40 duplicaciones en cultivo;
 - b. unión y expansión sobre un recipiente de cultivo de tejido recubierto o sin recubrir, en la que el recipiente de cultivo de tejido recubierto comprende un recubrimiento de gelatina, laminina, colágeno, poliornitina, vitronectina o fibronectina;
 - c. producción de vimentina y alfa-actina de músculo liso;
 - d. producción de los marcadores de la superficie celular CD10, CD13, CD44, CD73, HLA-A,B,C, CD90 y PDGFr-alfa, como se detecta por citometría de flujo;
 - e. elevada expresión de genes endógenos que codifican interleucina 8, reticulón 1, ligando 1 de quimiocinas (motivo C-X-C) (actividad estimulante del crecimiento de melanoma, alfa); ligando 6 de quimiocinas (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica de granulocitos); ligando 3 de quimiocinas (motivo C-X-C); proteína 3 inducida por factor de necrosis tumoral alfa, con respecto a la expresión endógena de interleucina 8, reticulón 1, ligando 1 de quimiocinas (motivo C-X-C) (actividad estimulante del crecimiento de melanoma, alfa); ligando 6 de quimiocinas (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica de granulocitos); ligando 3 de quimiocinas (motivo C-X-C); proteína 3 inducida por factor de necrosis tumoral alfa en una célula humana que es un fibroblasto, un citoblasto mesenquimatoso, o una célula de la médula ósea de las crestas ilíacas, **como se caracteriza por** matriz de oligonucleótidos;
 - f. ausencia de producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ, como se detecta por citometría de flujo;
 - g. secreción de MCP-1, IL-6, GCP-2, IL-8, TIMP1, TPO, KGF, HGF, FGF, HBEGF, BDNF e IL-8, como se detecta por ELISA;
 - h. ausencia de secreción de SDF-1alfa, VEGF, TGF-beta2, ANG2 y PDGFbb, como se detecta por ELISA;
 - i. ausencia de expresión de CD80, CD86, B7-H2, HLA-G y CD178, como se detecta por citometría de flujo;
 - j. expresión de PD-L2, como se detecta por citometría de flujo; y
 - k. una disminución en la expresión de los siguientes genes con respecto a una célula humana que es un fibroblasto, un citoblasto mesenquimatoso, o una cresta ilíaca, como **se caracteriza por** matriz de oligonucleótidos: homeocaja 2 de baja estatura; proteína 2 de 27 kDa de choque térmico; ligando 12 de quimiocinas (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células del estroma); elastina; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); homeocaja 2 del mesénquima; homólogo 1 de la homeocaja del seno ocular; cristalina, alfa B; activador asociado a dishevelled de la morfogénesis 2; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralina 1; tetranectina; dominio de homología tres con src (SH3) y rico en cisteína; gen 1 de translocalización de linfocitos B, antiproliferativo; 25-hidroxilasa del colesterol; factor de transcripción 3 relacionado con runt; proteína hipotética FLJ23191; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de la procolágeno C-endopeptidasa; homólogo 7 de frizzled; gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C; proteína 5 de la homeocaja de iroquois; hefaestina; integrina, beta 8; glicoproteína 2 de las vesículas sinápticas; ADNc FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor 1 de tipo receptor de citocinas; canal de potasio activado por calcio de conductancia intermedia/pequeña, subfamilia N, miembro 4; integrina, alfa 7; proteína DKFZP586L151; co-activador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ); homólogo 2 de la homeocaja del seno ocular; proteína KIAA1034; respuesta 3 de crecimiento temprano; homeocaja 5 distal-less; proteína hipotética FLJ20373; familia 1 de la aldo-ceto reductasa, miembro C3 (3-alfa hidroxiesteroide deshidrogenasa, tipo II); biglicano; fibronectina 1; proencefalina; integrina, 1 similar a beta (con dominios de repetición similares a EGF); clon de ADNc EUROIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor C del péptido natriurético/guanilato ciclasa C (receptor C del péptido atrionatriurético); proteína hipotética FLJ14054; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222); proteína 5 de la membrana asociada a vesícula; proteína de la matriz extracelular 1 similar a fibulina que contiene EGF; tipo 3 de proteína de 19 kDa de interacción BCL2/adenovirus E1B; proteína 1 de unión de AE; polipéptido 1 de la subunidad VIIa de la citocromo c oxidasa (músculo); neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; y factor de crecimiento similar a la proteína de unión a la insulina 2, 36 kDa.
2. La célula aislada de la reivindicación 1 que pueden duplicarse suficientemente para generar rendimientos superiores a aproximadamente 10^{14} células en menos de aproximadamente 80 días en cultivo cuando se siembra a aproximadamente 10^3 células/cm².
3. Una célula aislada según la reivindicación 1 o 2 que mantiene un cariotipo normal al someterse a pases.
4. Una célula aislada según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha célula es obtenible por digestión enzimática de tejido del cordón umbilical humano con colagenasa, dispasa e hialuronidasa.
5. Una célula aislada según cualquiera de las reivindicaciones precedentes que se expande en presencia de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 15 % de suero añadido, en presencia o ausencia de beta-

mercaptoetanol, y en presencia o ausencia de factores de crecimiento añadidos que incluyen EGF, FGF, PDGF, VEGF, IGF o LIF.

- 5 6. Un cultivo celular terapéutico que comprende la célula de cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
7. El cultivo celular terapéutico de la reivindicación 6 que no estimula sustancialmente CMSP alógenas.
8. El cultivo celular terapéutico de las reivindicaciones 6 o 7, que no estimula sustancialmente una respuesta mediada por linfocitos *in vitro*, en comparación con controles alógenos en una reacción de linfocitos mixtos.
- 10 9. Una célula aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que dicha célula no estimula sustancialmente linfocitos T CD4⁺ intactos.
- 15 10. El cultivo celular terapéutico de la reivindicación 6 que comprende además uno o más de un vehículo farmacéuticamente aceptable, otro cultivo celular, un compuesto antiapoptótico, un compuesto antitrombogénico, un compuesto antiinflamatorio, un compuesto inmunosupresor, un compuesto inmunomodulador, un factor angiogénico y un factor neurotrófico.
- 20 11. Un método de derivación, a partir de tejido del cordón umbilical humano, de una célula aislada de la reivindicación 1, comprendiendo el método las etapas de:
- (a) obtener tejido del cordón umbilical humano;
 - (b) eliminar sustancialmente toda la sangre para dar un tejido del cordón umbilical sustancialmente libre de sangre;
 - 25 (c) disociar el tejido por tratamiento enzimático con colagenasa, dispasa y hialuronidasa;
 - (d) resuspender el tejido en un medio de cultivo; y
 - (e) proporcionar condiciones de crecimiento que permiten el crecimiento de la célula de la reivindicación 1.
- 30 12. El método de la reivindicación 11 que comprende además la etapa de seleccionar células adherentes después de aproximadamente diez a aproximadamente 100 horas en cultivo.
13. Un método según la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en la que la etapa de disociación comprende incubar a aproximadamente 37 °C.
- 35 14. Un método según la reivindicación 13, en la que la incubación es durante una o más horas.
15. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 11-14, en la que la célula derivada se une y expande sobre un recipiente de cultivo de tejido recubierto o sin recubrir, en el que el recipiente de cultivo de tejido recubierto comprende un recubrimiento con gelatina, laminina, colágeno, poliornitina, polilisina, vitronectina o fibronectina.
- 40 16. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 11-15, en el que la célula derivada se expande en presencia de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 15 % de suero bovino fetal, en presencia o ausencia de beta-mercaptoetanol, y en presencia o ausencia de uno o más factores de crecimiento añadidos que incluyen EGF, FGF, PDGF, VEGF, IGF y LIF.
- 45 17. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 11-16, en el que la etapa de proporcionar incluye proporcionar oxígeno de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 20 %, y proporcionar L-valina.
- 50 18. El método según cualquiera de las reivindicaciones 11-17, en el que dicha etapa de disociación comprende además tratamiento mecánico.
19. El cultivo de cualquiera de las reivindicaciones 6-8 o 10, que comprende adicionalmente otra célula de mamífero de cualquier fenotipo.
- 55 20. El cultivo de la reivindicación 19, que comprende una línea celular humana.
21. Una matriz tridimensional que comprende la célula de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o 9, y una matriz que comprende un polímero biocompatible o bioabsorbible.
- 60 22. Un dispositivo implantable que comprende el cultivo celular de cualquiera de las reivindicaciones 6-8, 10 o 19-20.
23. Una matriz de tejido humano implantable que comprende la célula de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o 9.