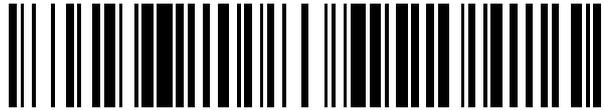


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 780**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2004 E 10184796 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2016 EP 2336298**

54 Título: **Células posparto derivadas de tejido placentario 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:

12.05.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 569 780 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 PLACENTARIO Y MÉTODOS DE PREPARACIÓN Y USO DE LAS MISMAS

Descripción

5

CAMPO DE LA INVENCION

10 La presente invención se refiere al campo de la biología de las células de mamífero y al cultivo celular. En particular, la invención se refiere a células cultivadas derivadas de tejido placentario posparto que tienen el potencial de diferenciarse a múltiples linajes, y a métodos de preparación y uso de esas células derivadas de la placenta.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 La generación de órganos y tejidos a partir de células ofrece tratamientos prometedores para varias patologías, lo que hace que las células madre sean un foco central de investigación en muchos campos. Las células madre humanas pueden generar diversos linajes celulares humanos maduros. El trasplante de tales células ha proporcionado una herramienta clínica para reconstituir un tejido diana, restaurando así la funcionalidad fisiológica y anatómica. La aplicación de la tecnología de células madre es muy amplia, e incluye la ingeniería de tejidos, la administración de terapia génica, y la terapéutica celular de trastornos que incluyen trastornos malignos, enzimopatías congénitas, hemoglobinopatías e inmunodeficiencias.

20 Un obstáculo a la hora de materializar el potencial terapéutico de la tecnología de células madre ha sido la dificultad para obtener un número suficiente de células madre humanas. Una fuente de células madre es el tejido embrionario o fetal. Se han aislado células progenitoras y madre embrionarias a partir de varias especies de mamíferos, incluidos los seres humanos. Sin embargo, la obtención de células madre a partir de fuentes embrionarias o fetales ha planteado muchas cuestiones éticas y morales.

25 También se han aislado células madre a partir de tejidos adultos. Los métodos para el aislamiento de células madre a partir de fuentes adultas suelen producir solamente cantidades limitadas de células y/o células que tienen una capacidad limitada para diferenciarse.

30 Los tejidos posparto han generado interés como fuente alternativa de células madre humanas. Por ejemplo, se han descrito métodos de recuperación de células madre mediante la perfusión de la placenta o la recogida de sangre de cordón umbilical. Una limitación para la obtención de células madre mediante estos métodos ha sido un volumen inadecuado de sangre de cordón umbilical o la cantidad de células obtenidas.

35 Por lo tanto, sigue existiendo una gran demanda de fuentes alternativas de suministro adecuado de células con capacidad de diferenciarse a una serie de linajes celulares para la crioconservación y/o su uso en aplicaciones clínicas. Tales células pueden utilizarse en ensayos de selección de fármacos, para la crioconservación y/o la creación de bancos, y para aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas.

RESUMEN DE LA INVENCION

40 La invención proporciona una población homogénea aislada de células derivadas de la placenta humana que puede obtenerse mediante digestión enzimática con una metaloproteasa de matriz, una proteasa neutra y una enzima mucolítica de placenta humana exenta de sangre, y en la que dicha población de células es capaz de autorrenovación y expansión en cultivo, tiene el potencial de diferenciarse a células de otros fenotipos, y en la que las células:

- 50 (a) producen cada uno de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFR-alfa y HLA-A,B,C, detectado mediante citometría de flujo;
 (b) no producen CD31, CD34, CD45 CD117, CD141 ni HLA-DR,DP,DQ, detectado mediante citometría de flujo; y
 (c) secretan proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP1a).

55 La invención también proporciona una matriz que comprende la población de células de la invención.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende la población de células de la invención.

60 La invención también proporciona un cultivo de células que comprende la población de células de la invención.

65 La invención también proporciona un kit que comprende la población de células de la invención y un componente adicional seleccionado de entre un armazón, un agente hidratante, un sustrato de cultivo celular y medios de cultivo celular.

La invención también proporciona la población de células de la invención, la matriz de la invención, la composición farmacéutica de la invención o el cultivo celular de la invención para su uso terapéutico.

5 La presente invención se refiere a células derivadas de la placenta posparto. Las células de la invención pueden caracterizarse por una cualquiera o más de las características que incluyen la presencia o ausencia de marcadores de superficie celular, los métodos de extracción a partir de tejido placentario, los perfiles de expresión génica, los perfiles de producción de proteínas, la secreción de factores, las características de crecimiento, o cualquier combinación de tales características.

10 La invención se refiere a células derivadas de tejido placentario posparto humano exento de sangre. Las células de la invención pueden autorrenovarse y expandirse en cultivo. Las células de la invención tienen el potencial de diferenciarse a células de otro fenotipo. En algunas formas de realización, la célula derivada de placenta necesita L-valina para crecer. Las células derivadas de la placenta de la invención pueden crecer con una concentración de oxígeno de entre aproximadamente un 5% y aproximadamente un 20%. En algunas formas de realización de la
15 divulgación, las células derivadas de la placenta presentan al menos una de las siguientes características:

(a) producción de al menos uno de entre factor tisular, vimentina, proteína quimiotáctica para granulocitos 2 (GCP-2), y alfa actina de músculo liso;

20 (b) ausencia de producción de al menos uno de entre GRO-alfa y el receptor de lipoproteína de baja densidad oxidada, detectado mediante citometría de flujo;

(c) producción de al menos uno de entre CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFR-alfa, PD-L2 y HLA-A,B,C;

25 (d) ausencia de producción de al menos uno de entre CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G, y HLA-DP,DQ,DR, detectado mediante citometría de flujo;

30 (e) expresión, que en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal o una célula de médula ósea de cresta iliaca, está aumentada para al menos uno de entre miembro A2 de la superfamilia de lectinas tipo C, tumor de Wilms 1, miembro A2 de la familia de aldehído deshidrogenasa 1, renina, receptor de lipoproteína de baja densidad oxidada 1, proteína quinasa C zeta, clon IMAGE:4179671, proteína hipotética DKFZp564F013, regulada por disminución en el cáncer de ovario 1 y clon DKFZp547K1113;

35 (f) expresión, que en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal o una célula de médula ósea de cresta iliaca, está reducida para al menos uno de entre: caja homeótica de la baja estatura 2; proteína 2 de choque térmico de 27 kDa; ligando 12 de quimiocina (motivo C-X-C) (factor derivado de células del estroma 1); elastina; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); caja homeótica de mesénquima 2; homólogo 1 de caja homeótica de "sine oculis"; cristalina, alfa B; activador de morfogénesis asociado a "dishevelled" 2; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralin 1; tetranectina; dominio 3 de homología con src (SH3) y rico en cisteínas; gen 1 de translocación de linfocitos B, antiproliferativa; colesterol 25-hidroxilasa; factor de transcripción relacionado con el enanismo 3; proteína hipotética FLJ23191; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de la procolágeno C-endopeptidasa; homólogo de "frizzeld" 7; gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C; proteína 5 de caja homeótica de "iroquois"; hefaestina; integrina, beta 8; glicoproteína de vesícula sináptica 2; ADNc FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor similar
40 al receptor de citocinas 1; canal de potasio activado por calcio de conductancia intermedia/baja, subfamilia N, miembro 4; integrina, alfa 7; proteína DKFZP586L151; coactivador de la transcripción con motivo de unión a PDZ (TAZ); homólogo 2 de caja homeótica de "sine oculis"; proteína KIAA1034; respuesta de crecimiento precoz 3; caja homeótica de "distal-less" 5; proteína hipotética FLJ20373; familia 1 de aldo-ceto reductasa, miembro C3 (3-alfa hidroxisteroide deshidrogenasa, tipo II); biglicano; fibronectina 1; proencefalina; integrina, tipo beta 1 (con dominios de repetición tipo EGF); clon de ADNc EUROIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor del péptido natriurético C/guanilato ciclasa C (receptor de péptido natriurético atrial C); proteína hipotética FLJ14054; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222); proteína de membrana asociada a vesículas 5; proteína de matriz extracelular tipo fibulina que contiene EGF 1; similar a proteína 3 de interacción con BCL2/adenovirus E1B de 19 kDa; proteína 1 de unión a AE; polipéptido 1 de la subunidad VIIa de la citocromo c oxidasa (músculo);
45 neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; y proteína de unión a factor de crecimiento insulinoide 2, 36 kDa;

50 (g) secreción de al menos uno de entre proteína quimiotáctica para monocitos 1 (MCP-1), interleucina-6 (IL-6), factor 1 alfa derivado de células del estroma (SDF-1 alfa), interleucina 8 (IL-8), proteína quimiotáctica para granulocitos 2 (GCP-2), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), inhibidor tisular de la metaloproteínasa de matriz 1 (TIMP1), trombopoyetina (TPO), proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP1a), Rantes (expresada y secretada por el linfocito T normal en función de su grado de activación), quimiocina regulada por el timo y por activación (TARC), y eotaxina;

65

(h) ausencia de secreción de al menos uno de entre factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), angiopoyetina 2 (ANG2), factor de crecimiento plaquetario (PDGF-bb), factor de crecimiento transformante beta 2 (TGFbeta2), proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (MIP1b), I309, y quimiocina derivada de macrófagos (MDC), detectado mediante ELISA; y

5

(i) capacidad de experimentar al menos 40 duplicaciones de la población en cultivo.

En formas de realización específicas, la célula tiene todas las características identificativas de cualquiera de: el tipo de célula PLA 071003 (P8) (nº de registro ATCC PTA-6074); el tipo de célula PLA 071003 (P11) (nº de registro ATCC PTA-6075); y el tipo de célula PLA 071003 (P16) (nº de registro ATCC PTA-6079). Las células derivadas de la placenta de la invención son células humanas. Las células de la invención pueden ser de linaje neonatal, de linaje materno, o una combinación de los mismos.

10

La invención también proporciona células derivadas de la placenta aisladas a partir de una placenta posparto o fragmento de la misma mediante disociación enzimática con una metaloproteasa de matriz (MMP); una metaloproteasa de matriz y una proteasa neutra; una metaloproteasa de matriz y una enzima mucolítica que digiere el ácido hialurónico; o una metaloproteasa de matriz, una proteasa neutra y una enzima mucolítica que digiere el ácido hialurónico. Las metaloproteasas de matriz preferentes incluyen la colagenasa. La proteasa neutra es preferentemente la termolisina o la dispasa, y lo más preferentemente, es la dispasa. La enzima mucolítica que digiere el ácido hialurónico es preferentemente la hialuronidasa. Son muy útiles las series de combinaciones enzimáticas LIBERASE (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN) Blendzyme (Roche) y pueden utilizarse en los métodos de la presente invención. Se conocen otras fuentes de enzimas, y el experto en la técnica también puede obtener tales enzimas directamente de sus fuentes naturales. El experto en la técnica también está preparado para evaluar enzimas o combinaciones enzimáticas nuevas o adicionales por su utilidad en el aislamiento de las células de la invención. Los tratamientos enzimáticos preferentes tienen una duración de 0,5 horas, 1 hora, 1,5 horas ó 2 horas, o más. En las formas de realización más preferentes, el tejido se incuba a 37°C durante el tratamiento enzimático de la etapa de disgregación.

15

20

25

En algunas formas de realización de la invención, el tejido placentario se separa en fracciones antes de extraer las células, de manera que la célula sea predominantemente de origen neonatal o materno. En algunos aspectos de la invención, el tejido placentario se disocia mecánicamente antes de la etapa de disociación enzimática. En algunas formas de realización, el método de aislamiento de las células de la invención implica adicionalmente cultivar las células en medio de cultivo. El medio de cultivo es preferentemente RPMI1640, medio F10 de Ham, medio F12 de Ham, medio Mesenchymal Stem Cell Growth Medium, medio de Dulbecco modificado por Iscove, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), Advanced DMEM (Gibco), DMEM/MCDB201 (Sigma), CELL-GRO FREE, DMEM/F12, o medio basal de Eagle. En algunos aspectos de la invención, el medio de cultivo se complementa con aproximadamente un 2% a aproximadamente un 15% de suero (v/v), beta-mercaptoetanol, glucosa, y/o un antibiótico y un antimicótico. El medio de cultivo es preferentemente Medio de crecimiento que comprende DMEM, glucosa, beta-mercaptoetanol, suero y un antibiótico. El medio de cultivo puede contener al menos uno de entre factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento plaquetario, factor de crecimiento del endotelio vascular, factor de crecimiento epidérmico y factor inhibidor de la leucemia. Las células de la invención pueden cultivarse sobre una superficie recubierta o no recubierta. Las superficies para el cultivo de las células pueden estar recubiertas por ejemplo con gelatina, colágeno (por ejemplo, natural o desnaturalizado), fibronectina, laminina, ornitina, vitronectina o proteína de la membrana extracelular (por ejemplo, MATRIGEL (BD Discovery Labware, Bedford, MA)).

30

35

40

45

La invención incluye dentro de su alcance células derivadas de la placenta caracterizadas por características de crecimiento, tales como, pero no limitadas a, células que producen más de aproximadamente 10^{17} células en aproximadamente 60 días tras la siembra inicial de aproximadamente 1.000 células/cm² a aproximadamente 5.000 células/cm². En algunas formas de realización, las células derivadas de la placenta de la invención tienen la capacidad de experimentar al menos 40 duplicaciones de la población en aproximadamente 80 días en cultivo.

50

Las células derivadas de la placenta de la invención pueden utilizarse desde el primer subcultivo (pase 0) hasta la senescencia. El número preferente de pases es el que produce un número suficiente de células para una aplicación determinada. En determinadas formas de realización, las células se someten a pases de 2 a 25 veces, preferentemente de 4 a 20 veces, más preferentemente 8 a 15 veces, más preferentemente 10 u 11 veces, y lo más preferentemente 11 veces.

55

También se contemplan métodos para inducir la diferenciación de las células derivadas de la placenta de la invención. En algunas formas de realización de la invención, las células derivadas de la placenta son inducidas a un linaje mesodérmico, ectodérmico o endodérmico. Por ejemplo, puede inducirse a las células a diferenciarse a un linaje adipogénico, condrogénico, osteogénico, neurogénico, oculogénico, pancreogénico, cardiomiogénico o hepatogénico. Los métodos de inducción de la diferenciación de las células de la invención implican preferentemente poner en contacto o exponer las células a uno o más agentes inductores de la diferenciación. En algunas formas de realización, dicho contacto o exposición se produce en cultivo.

60

65

Las células de la invención pueden modificarse por ingeniería genética para que expresen un gen de interés o para que produzcan una proteína de interés tal como, pero sin limitarse a, una proteína terapéutica. Por ejemplo, las PDC pueden modificarse por ingeniería genética para que expresen un compuesto antiinflamatorio o un agente antiapoptótico.

5 Los métodos de la divulgación incluyen adicionalmente métodos de producción de una población de células derivadas de la placenta expandiendo una célula o células de la invención en cultivo. Las PDC ser inducidas a diferenciarse o estar indiferenciadas. En algunas formas de realización, una población de células derivadas de la placenta está mezclada con otra población de células. En algunas formas de realización, la población de células es heterogénea. Una población heterogénea de células de la invención puede comprender al menos aproximadamente un 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ó 95% de PDC inducidas a diferenciarse o indiferenciadas de la invención. Las poblaciones de células heterogéneas de la invención pueden comprender adicionalmente células de un linaje mesodérmico, endodérmico o ectodérmico. Las poblaciones de células de la invención pueden ser homogéneas. Las poblaciones homogéneas de células derivadas de la placenta pueden ser de linaje neonatal o materno. La homogeneidad de una población de células puede conseguirse mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, mediante clasificación de células (por ejemplo, citometría de flujo) o mediante expansión clonal.

20 Algunas formas de realización de la divulgación proporcionan métodos de fabricación de una matriz de tejido para la implantación en un paciente, sembrando una o más células derivadas de la placenta de la invención sobre o dentro de una matriz de tejido para la implantación en un paciente. En una forma de realización de la divulgación, las PDC pueden estar diferenciadas o indiferenciadas. La matriz puede contener uno o más factores, incluidos fármacos, agentes antiapoptóticos (por ejemplo, eritropoyetina (EPO), mimetocuerpo de la EPO, trombotopoyetina, factor de crecimiento insulinoide (IGF)-I, IGF-II, factor de crecimiento de hepatocitos, inhibidores de caspasas), compuestos antiinflamatorios (por ejemplo, inhibidores de p38 MAP quinasa, inhibidores de TGF-beta, estatinas, inhibidores de IL-6 e IL-1, PEMIROLAST, TRANILAST, REMICADE, SIROLIMUS, y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) (tales como TEPOXALIN, TOLMETIN y SUPROFEN)), así como anestésicos locales, y factores de crecimiento. En algunos aspectos de la divulgación, la matriz comprende tejido descelularizado, tal como matriz extracelular o lisados celulares de las PDC. En algunas formas de realización, la matriz es biodegradable. En algunos aspectos de la invención, la matriz comprende polímeros naturales o sintéticos. Las matrices de la invención incluyen armazones biocompatibles, estructuras reticulares, estructuras de autoensamblaje y similares, ya sean biodegradables o no, líquidas o sólidas. Tales matrices se conocen en la técnica de la terapia celular, la reparación quirúrgica, la ingeniería de tejidos y la cicatrización de heridas. Preferentemente, las matrices se tratan previamente (por ejemplo, se siembran, inoculan, se ponen en contacto) con las células de la invención. Más preferentemente, las matrices se pueblan con células en estrecha asociación con la matriz o sus espacios. En algunos aspectos de la invención, las células se adhieren a la matriz. En algunas formas de realización, las células están contenidas dentro de o entrecruzan los espacios intersticiales de la matriz. Las más preferentes son las matrices sembradas en las que las células se encuentran en estrecha asociación con la matriz y que, cuando se utilizan terapéuticamente, inducen o sustentan la increscencia de las células del paciente y/o la angiogénesis apropiada. Las matrices sembradas pueden introducirse en el cuerpo de un paciente de cualquier manera conocida en la técnica, incluida pero no limitada a la implantación, inyección, fijación quirúrgica, trasplante con otro tejido, y similares. Los ejemplos de armazones que pueden utilizarse en la presente invención incluyen mallas no tejidas, espumas porosas o péptidos de autoensamblaje. Las mallas no tejidas pueden formarse, por ejemplo, utilizando fibras compuestas por un copolímero absorbible sintético de ácidos glicólico y láctico (PGA/PLA), que se vende con el nombre comercial VICRYL (Ethicon, Inc., Somerville, NJ). También son posibles armazones las espumas, compuestas, por ejemplo, por copolímero poli(epsilon-caprolactona)/poli(ácido glicólico) (PCL/PGA), formadas mediante procesos tales como la criodesecación, o liofilizadas, como se analiza en la patente de EE.UU. nº 6.355.699. También pueden utilizarse hidrogeles tales como péptidos de autoensamblaje (por ejemplo, RAD16). Estos materiales se utilizan frecuentemente como soportes para el crecimiento de tejido. Las matrices de la invención pueden configurarse de acuerdo a la forma y/o el tamaño de un tejido u órgano *in vivo*. Los armazones de la invención pueden ser planos o tubulares o pueden comprender secciones de los mismos. Los armazones de la invención pueden tener múltiples capas. Se proporcionan órganos y tejidos que comprenden las PDC de la invención, y se dan a conocer órganos que comprenden la matriz extracelular de las PDC o su lisado celular.

55 También quedan comprendidas dentro del alcance de la divulgación las matrices extracelulares de PDC, las fracciones celulares (por ejemplo, fracciones celulares solubles) de PDC y un medio acondicionado de PDC.

60 En algunas formas de realización, la invención proporciona composiciones de PDC y uno o más factores bioactivos, por ejemplo, pero sin limitarse a, factores de crecimiento, agentes antiapoptóticos, antiinflamatorios y/o factores inductores de la diferenciación.

65 Las células, las matrices, los tejidos y las composiciones de la invención pueden crioconservarse. Pueden almacenarse o crearse bancos de las células y composiciones crioconservadas de la invención. También se contemplan métodos para crioconservar y/o almacenar las células derivadas posparto de la invención.

Las composiciones de PDC y productos relacionados, incluidas por ejemplo, las composiciones farmacéuticas, están incluidas dentro del alcance de la invención. Las composiciones de PDC pueden incluir uno o más de entre un factor inductor de la diferenciación, un factor de supervivencia celular tal como un inhibidor de caspasas, un antiinflamatorio tal como inhibidor de la p38 quinasa, factores de crecimiento tales como PDGF-bb, EGF, bFGF, LIF, IGF-1 o VEGF, o un factor angiogénico tal como VEGF o bFGF. Las composiciones farmacéuticas de las células derivadas de la placenta están incluidas dentro del alcance de la invención, y las composiciones farmacéuticas de la matriz extracelular producidas de ese modo, los lisados celulares de la misma, y el medio acondicionado de PDC están incluidos dentro del alcance de la divulgación. Las composiciones farmacéuticas incluyen preferentemente un transportador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En algunas formas de realización, se proporcionan células derivadas de la placenta o matrices de la invención para su uso en métodos de trasplante, y métodos de regeneración de un tejido u órgano en un paciente que lo necesita, en las que los métodos comprenden el trasplante de dichas células o matrices de la invención en un paciente.

La invención proporciona adicionalmente células derivadas de la placenta, poblaciones de PDC, matrices o composiciones de la invención, para su uso en métodos de tratamiento de una enfermedad o lesión en un paciente administrando una o más de dichas células derivadas de la placenta, poblaciones de PDC, matrices o composiciones.

La invención también abarca cultivos celulares de las células derivadas de la placenta de la invención. Preferentemente, los cultivos de la invención pueden experimentar al menos 40 duplicaciones de la población tras la siembra inicial.

La célula y las composiciones de la invención pueden utilizarse, por ejemplo, en el tratamiento de afecciones o reparación de tejidos. En algunas formas de realización de la invención, la afección a tratar es una afección de tejido blando (por ejemplo, piel, músculo, vasculatura, tendones, ligamentos, vejiga, fascia, suelo pélvico), hueso, páncreas, riñón, hígado, sistema nervioso, ojo, corazón o cartílago.

Los métodos de la divulgación incluyen adicionalmente métodos de producción de una población de células derivadas de la placenta expandiendo una célula de la invención en cultivo.

Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada y los ejemplos que siguen a continuación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN ILUSTRATIVAS

Definiciones

Se definen diversos términos y expresiones utilizados a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones como se indica a continuación.

Las *células madre* son células indiferenciadas definidas por su capacidad a nivel de célula individual tanto para la autorrenovación como para la diferenciación para producir células descendientes, incluidas células progenitoras autorrenovantes, progenitoras no renovantes y terminalmente diferenciadas. Las células madre también se caracterizan por su capacidad para diferenciarse *in vitro* a células funcionales de diversos linajes celulares de múltiples capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), así como para dar lugar a los tejidos de múltiples capas germinales después del trasplante y para contribuir sustancialmente a la mayoría, si no todos, los tejidos después de inyectarse en blastocistos.

Las células madre se clasifican por su potencial de desarrollo como: (1) *totipotentes* - capaces de dar lugar a todos los tipos de células embrionarias y extraembrionarias; (2) *pluripotentes* - capaces de dar lugar a todos los tipos de células embrionarias; (3) *multipotentes* - capaces de dar lugar a un subconjunto de los linajes celulares, pero todos dentro de un tejido, órgano o sistema fisiológico concreto (por ejemplo, las células madre hematopoyéticas (HSC) pueden producir una descendencia que incluye las HSC (autorrenovantes), progenitoras oligopotentes limitadas a células sanguíneas, y todos los tipos de células y elementos (por ejemplo, plaquetas) que son componentes normales de la sangre; (4) *oligopotentes* - capaces de dar lugar a un subconjunto más restringido de linajes celulares que las células madre multipotentes; y (5) *unipotente* - capaces de dar lugar a un único linaje celular (por ejemplo, células madre espermatogénicas).

Las células madre también se clasifican en base a la fuente de la que pueden obtenerse. Una *célula madre adulta* es generalmente una célula indiferenciada multipotente que se encuentra en tejido que comprende múltiples tipos de células diferenciadas. La célula madre adulta puede autorrenovarse y, en circunstancias normales, diferenciarse para producir los tipos especializados de células del tejido del que se originó, y posiblemente otros tipos de tejidos. Una *célula madre embrionaria* es una célula pluripotente de la masa celular interna de un embrión en fase de blastocisto. Una *célula madre fetal* es la que procede de tejidos o membranas fetales. Una *célula madre*

posparto es una célula multipotente o pluripotente que procede sustancialmente de tejido extraembrionario disponible después del nacimiento, a saber, la placenta y el cordón umbilical. Se ha descubierto que estas células poseen rasgos característicos de las células madre pluripotentes, incluidos la rápida proliferación y el potencial de diferenciarse a muchos linajes celulares. Las células madre posparto pueden ser de origen sanguíneo (por ejemplo, como las obtenidas a partir de sangre de cordón umbilical) o de origen no sanguíneo (por ejemplo, como las obtenidas a partir de tejidos no sanguíneos del cordón umbilical y la placenta).

El *tejido embrionario* se define por lo general como tejido de origen embrionario (que en los seres humanos se refiere al período desde la fertilización hasta aproximadamente seis semanas de desarrollo). *Tejido fetal*, se refiere a tejido de origen fetal, que en los seres humanos se refiere al período desde aproximadamente seis semanas de desarrollo hasta el parto. El *tejido extraembrionario* es el tejido asociado con, pero no procede de, el embrión o el feto. Los tejidos extraembrionarios incluyen las membranas extraembrionarias (corion, amnios, saco vitelino y alantoides), el cordón umbilical y la placenta (que se forma a partir del corion y de la decidua basal materna).

La *diferenciación* es el proceso mediante el cual una célula no especializada ("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* o *inducida a diferenciarse* es la que ha adquirido 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 la que, en circunstancias normales, continuará diferenciándose hasta un tipo de célula o subconjunto de tipos de células específico, y no puede, en circunstancias normales, diferenciarse a un tipo de célula diferente o volver a un tipo de célula menos diferenciada. *Desdiferenciación* se refiere al proceso mediante el cual una célula vuelve a una posición menos especializada (o comprometida) dentro del linaje de una célula. Tal como se utiliza en el presente documento, el *linaje* de una célula define la herencia de la célula, es decir, de qué células procedía y a qué células puede dar lugar. El linaje de una célula coloca a la célula dentro de un esquema hereditario de desarrollo y diferenciación. Un *marcador específico de linaje* se refiere a una característica asociada específicamente con el fenotipo de las células de un linaje de interés y puede utilizarse para evaluar la diferenciación de una célula no comprometida al linaje de interés.

En un sentido amplio, una *célula progenitora* es una célula que tiene la capacidad de crear una descendencia que está más diferenciada que ella misma y que, sin embargo, conserva la capacidad de reponer la reserva de progenitoras. Según esta definición, las propias células madre también son células progenitoras, ya que son las precursoras más inmediatas a las células terminalmente diferenciadas. Cuando se hace referencia a las células de la presente invención, tal como se describen con mayor detalle más adelante, puede utilizarse esta definición amplia de *célula progenitora*. En un sentido más estricto, una célula progenitora suele definirse como una célula que es una célula intermedia en la vía de diferenciación, es decir, que surge de una célula madre y es una célula intermedia en la producción de un tipo de célula o un subconjunto de tipos de células maduras. Este tipo de célula progenitora no es capaz, en general, de autorrenovación. Por consiguiente, si se hace referencia a este tipo de célula en el presente documento, se denominará *célula progenitora no renovante* o *progenitora intermedia* o *célula precursora*.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión *se diferencia a un linaje mesodérmico, ectodérmico o endodérmico* se refiere a una célula que se compromete a un linaje mesodérmico, ectodérmico o endodérmico específico, respectivamente. Los ejemplos de células que se diferencian a 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 estromales. Los ejemplos de células que se diferencian al linaje ectodérmico incluyen, pero no se limitan a células epidérmicas, células neurogénicas y células neurogliagénicas. Los ejemplos de células que se diferencian al linaje endodérmico incluyen, pero no se limitan a células pleurigénicas y células hepatogénicas, células que dan lugar al revestimiento del intestino, y células que dan lugar a células pancreogénicas y esplacnogénicas.

Las células de la presente invención se denominan *células derivadas de la placenta (PDC)*. También pueden denominarse a veces en el presente documento *células derivadas posparto* o *células posparto (PPDC)*. Además, las células pueden describirse como células madre o progenitoras, utilizándose esta última expresión en el sentido amplio. El término *derivada* se utiliza para indicar que las células se han obtenido de su fuente biológica y se han cultivado o manipulado de otra manera *in vitro* (por ejemplo, se han cultivado en un medio de crecimiento para expandir la población y/o para producir una línea celular). Más adelante se describen detalladamente las manipulaciones *in vitro* de células derivadas de la placenta y las características únicas de las células derivadas de la placenta de la presente invención.

Se utilizan diversos términos y expresiones para describir las células en cultivo. *Cultivo celular* se refiere en general a células sacadas de un organismo vivo y cultivadas en condiciones controladas ("en cultivo"). Un *cultivo de células primarias* es un cultivo de células, tejidos u órganos sacados directamente de los organismos y antes del primer subcultivo. Las células se *expanden* en cultivo cuando se colocan en un medio de crecimiento en condiciones

que facilitan el crecimiento y/o la división celular, lo que da como resultado una población mayor de las células. Cuando las células se expanden en cultivo, la tasa de proliferación celular se mide a veces por la cantidad de tiempo necesario para que las células dupliquen su número. Esto se conoce como *tiempo de duplicación*.

5 Una *línea celular* es una población de células formada mediante uno o más subcultivos de un cultivo de células primarias. Cada ronda de subcultivo se denomina *pase*. Cuando se subcultivan las células, se dice que han sido *sometidas a pases*. Una población específica de células, o una línea celular, se denomina o caracteriza a veces por el número de veces que se ha sometido a pases. Por ejemplo, una población de células cultivadas que se ha sometido a pases diez veces puede denominarse *cultivo P10*. El cultivo primario, es decir, el primer cultivo después del aislamiento de las células a partir del tejido, se indica como P0. Después del primer subcultivo, las células se describen como cultivo secundario (P1 o pase 1). Después del segundo subcultivo, las células se convierten en un cultivo terciario (P2 o pase 2), y así sucesivamente. Los expertos en la materia entenderán que puede haber muchas duplicaciones de población durante el período de pases; por lo tanto, el número de duplicaciones de la población de un cultivo es superior al número de pases. La expansión de las células (es decir, el número de duplicaciones de la población) durante el periodo entre pases depende de muchos factores, incluidos pero no limitados a la densidad de siembra, el sustrato, el medio y el tiempo entre pases.

20 Un *medio acondicionado* es un medio en el que se ha cultivado, y del que a continuación se ha sacado, una célula o población de células específica. Mientras las células se cultivan en el medio, secretan 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.

25 En general, un *factor trófico* se define como una sustancia que fomenta la supervivencia, el crecimiento, la proliferación, el mantenimiento, la diferenciación y/o la maduración de una célula, o estimula el aumento de la actividad de una célula.

30 Cuando se hace referencia a células de vertebrados en cultivo, el término *senescencia* (también *senescencia replicativa* o *senescencia celular*) se refiere a una propiedad atribuible a los cultivos celulares finitos; a saber, su incapacidad para crecer más allá de un número finito de duplicaciones de la población (a veces denominado *límite de Hayflick*). A pesar de que la senescencia celular se describió por primera vez utilizando células similares a fibroblastos, la mayoría de los tipos normales de células humanas que pueden hacerse crecer con éxito en cultivo experimentan senescencia celular. La longevidad *in vitro* de los diferentes tipos de células varía, pero la longevidad máxima es por lo general inferior a 100 duplicaciones de la población (este es el número de duplicaciones para que todas las células en el cultivo se vuelvan senescentes y, por lo tanto, que hace que el cultivo sea incapaz de dividirse). La senescencia no depende del tiempo cronológico, sino que se mide por el número de divisiones celulares, o duplicaciones de la población, que ha experimentado el cultivo. Por lo tanto, las células que se hacen quiescentes eliminando los factores de crecimiento esenciales pueden reanudar su crecimiento y división cuando se vuelven a introducir los factores de crecimiento, y, posteriormente, llevar a cabo el mismo número de duplicaciones que las células equivalentes que han crecido continuamente. Del mismo modo, cuando las células se congelan en nitrógeno líquido después de diversos números de duplicaciones de la población y, a continuación, se descongelan y 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; en realidad son resistentes a la muerte celular programada (apoptosis), y se han mantenido en su estado de no división durante hasta tres años. Estas células están realmente vivas y metabólicamente activas, pero no se dividen. Todavía no se ha descubierto que el estado de no división de las células senescentes sea reversible mediante algún agente biológico, químico o viral.

50 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión *Medio de crecimiento* se refiere a un medio de cultivo suficiente para la expansión de las células derivadas de la placenta. El medio de cultivo del Medio de crecimiento contiene preferentemente medio esencial modificado de Dulbecco (DMEM). Más preferentemente, el Medio de crecimiento contiene glucosa. El Medio de crecimiento contiene preferentemente DMEM con bajo contenido de glucosa (DMEM-LG) (Invitrogen, Carlsbad, CA). El Medio de crecimiento contiene preferentemente aproximadamente un 15% (v/v) de suero (por ejemplo, suero bovino fetal, suero bovino definido). El Medio de crecimiento contiene preferentemente al menos un antibiótico y/o antimicótico (por ejemplo, penicilina, estreptomycin, anfotericina B, gentamicina, nistatina, preferentemente 50 unidades/mililitro de penicilina G sódica y 50 microgramos/mililitro de sulfato de estreptomycin). El Medio de crecimiento contiene preferentemente 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis MO). Lo más preferentemente, el Medio de crecimiento contiene DMEM con bajo contenido de glucosa, suero, 2-mercaptoetanol, y un antibiótico y un antimicótico.

60 Tal como se utiliza en el presente documento, *condiciones normales de crecimiento* se refiere a las condiciones atmosféricas normales que comprenden CO₂ al 5% y una temperatura en el intervalo comprendido entre 35°C y 39°C, más preferentemente, 37°C, y una humedad relativa de aproximadamente el 100%.

65 El término *aislado* se refiere a una célula, un componente celular o una molécula que se ha sacado de su entorno natural. Las PDC, por ejemplo, pueden aislarse en algunas formas de realización de la invención.

El término *aproximadamente* se refiere a una aproximación de un valor indicado dentro de un intervalo de $\pm 10\%$.

5 El término *tratar (o tratamiento de) una afección* se refiere a mejorar los efectos de, o retardar, detener o revertir la evolución de, o retardar o prevenir la aparición de, una afección tal como, pero sin limitarse a, una anomalía congénita, una enfermedad o una lesión.

10 La expresión *cantidad eficaz* se refiere a una concentración de un reactivo o composición farmacéutica, tal como un factor de crecimiento, agente de diferenciación, factor trófico, población de células u otro agente, que es eficaz para producir un resultado deseado, incluido el crecimiento celular y/o la diferenciación *in vitro* o *in vivo*, o el tratamiento de una afección como se describe en el presente documento. Con respecto a los factores de crecimiento, una cantidad eficaz puede variar entre aproximadamente 1 nanogramo/mililitro y aproximadamente 1 microgramo/mililitro. Con respecto a las PDC como se administran a un paciente *in vivo*, una cantidad eficaz puede variar desde tan solo varios cientos o menos a tanto como varios millones o más. En formas de realización específicas, una cantidad eficaz puede variar entre 10^3 - 10^{11} . Se entenderá que el número de células a administrar variará dependiendo de las características específicas del trastorno a tratar, incluidas pero no limitadas al tamaño o al volumen/superficie total a tratar, así como la proximidad del sitio de administración a la ubicación de la zona a tratar, entre otros factores familiares para el biólogo médico.

20 Las expresiones *período (o tiempo) eficaz* y *condiciones eficaces* se refieren a un período de tiempo u otras condiciones controlables (por ejemplo, temperatura, humedad para métodos *in vitro*), necesarias o preferentes para que un agente o composición farmacéutica consiga el resultado deseado.

25 El término *paciente* o *sujeto* se refiere a animales, incluidos los mamíferos, preferentemente seres humanos, que se tratan con las composiciones farmacéuticas o según los métodos descritos en el presente documento.

30 El término *matriz* tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un soporte para las PPDC de la invención, por ejemplo, un armazón (por ejemplo, VICRYL, PCL/PGA o RAD16) o medio de soporte (por ejemplo, hidrogel, proteína de la membrana extracelular (por ejemplo, MATRIGEL (BD Discovery Labware, Bedford, MA))).

35 La expresión *transportador (o medio) farmacéuticamente aceptable*, que puede utilizarse de manera intercambiable con la expresión *transportador o medio biológicamente compatible*, se refiere a reactivos, células, compuestos, materiales, composiciones y/o formas farmacéuticas que son, dentro del alcance del criterio médico, adecuados para utilizarse en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otra complicación acorde con una relación beneficio/riesgo razonable. Como se describe con mayor detalle en el presente documento, los transportadores farmacéuticamente aceptables adecuados para utilizarse en la presente invención incluyen materiales líquidos, semisólidos (por ejemplo, geles) y sólidos (por ejemplo, armazones celulares). Tal como se utiliza en el presente documento, el término *biodegradable* describe la capacidad de un material para descomponerse (por ejemplo, degradarse, erosionarse, disolverse) *in vivo*. El término incluye la degradación *in vivo* eliminándose o sin eliminarse del cuerpo (por ejemplo, mediante resorción). Los materiales semisólidos y sólidos pueden diseñarse para que resistan la degradación dentro del cuerpo (*no biodegradables*) o pueden diseñarse para que se degraden dentro del cuerpo (*biodegradables, bioerosionables*). Un material biodegradable puede ser además *biorreabsorbible* o *bioabsorbible*, es decir, puede disolverse y absorberse en los líquidos corporales (los implantes hidrosolubles son un ejemplo), o degradarse y, finalmente, eliminarse del cuerpo, ya sea por conversión en otros materiales o por degradación y eliminación a través de vías naturales.

50 En el presente documento se utilizan diversos términos y expresiones con respecto a la terapia de reemplazo celular. Las expresiones *transferencia autóloga, trasplante autólogo, autoinjerto* y similares se refieren a tratamientos en los que el donante de células es también el receptor de la terapia de reemplazo celular. Los términos y expresiones *transferencia alogénica, trasplante alogénico, aloinjerto* y similares se refieren a tratamientos en los que el donante de células es de la misma especie que el receptor de la terapia de reemplazo celular, pero no es el mismo individuo. Una transferencia de células en la que las células del donante se han hecho coincidir en histocompatibilidad con un receptor se denomina a veces *transferencia singénica*. Las expresiones *transferencia xenogénica, trasplante xenogénico, xenoinjerto* y similares se refieren a tratamientos en los que el donante de células es de una especie diferente a la del destinatario de la terapia de reemplazo celular.

En el presente documento se utilizan las siguientes abreviaturas:

60 *ANG2* (o *Ang2*) para angiopoyetina 2;
APC para células presentadoras de antígenos;
BDNF para factor neurotrófico derivado del cerebro;
bFGF para factor de crecimiento de fibroblastos básico;
65 *bid (BID)* para "*bis in die*" (dos veces al día);
BSP para sialoproteína ósea;
CK18 para citoqueratina 18;

	<i>ligando 3 de CXC</i> para ligando 3 del receptor de quimiocinas;
	<i>DAPI</i> para 4'-6-diamidino-2-fenilindol-2HCl;
	<i>DMEM</i> para medio esencial mínimo de Dulbecco;
5	<i>DMEM:Ig</i> (o <i>DMEM:Lg</i> , <i>DMEM:LG</i>) para DMEM con bajo contenido de glucosa;
	<i>EDTA</i> para ácido etilendiaminotetraacético;
	<i>EGF</i> (o <i>E</i>) para factor de crecimiento epidérmico;
	<i>EPO</i> para eritropoyetina;
	<i>FACS</i> para clasificación de células activadas por fluorescencia;
10	<i>FBS</i> para suero bovino fetal;
	<i>FGF</i> (o <i>F</i>) para factor de crecimiento de fibroblastos;
	<i>GCP-2</i> para proteína quimiotáctica para granulocitos 2;
	<i>GDF-5</i> para factor 5 de crecimiento y diferenciación;
	<i>GFAP</i> para proteína ácida fibrilar de la glía;
15	<i>HB-EGF</i> para factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina;
	<i>HCAEC</i> para células endoteliales de arteria coronaria humana;
	<i>HGF</i> para factor de crecimiento de hepatocitos;
	<i>hMSC</i> para células madre mesenquimales humanas;
	<i>HNF-1 alfa</i> para factor de transcripción específico de hepatocitos;
20	<i>HUVEC</i> para células endoteliales de vena umbilical humana;
	<i>I309</i> para una quimiocina y el ligando para el receptor CCR8;
	<i>IGF</i> para factor de crecimiento insulinoide;
	<i>IL-6</i> para interleucina-6;
	<i>IL-8</i> para interleucina 8;
25	<i>K19</i> para queratina 19;
	<i>K8</i> para queratina 8;
	<i>KGF</i> para factor de crecimiento de queratinocitos;
	<i>MCP-1</i> para proteína quimiotáctica para monocitos 1;
	<i>MDC</i> para quimiocina derivada de macrófagos;
30	<i>MIP1 alfa</i> para proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa;
	<i>MIP1beta</i> para proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta;
	<i>MMP</i> para metaloproteasa de matriz (MMP);
	<i>MSC</i> para células madre mesenquimales;
	<i>NHDF</i> para fibroblastos dérmicos humanos normales;
35	<i>NPE</i> para medio de expansión de progenitoras neurales;
	<i>OxLDLR</i> para receptor de lipoproteína de baja densidad oxidada;
	<i>PBMC</i> para células mononucleares de sangre periférica;
	<i>PBS</i> para solución salina tamponada con fosfato;
	<i>PDC</i> para célula derivada de la placenta;
40	<i>PDGFbb</i> para factor de crecimiento plaquetario;
	<i>PDGFr-alfa</i> para receptor del factor de crecimiento plaquetario alfa;
	<i>PD-L2</i> para ligando de muerte programada 2;
	<i>PE</i> para ficoeritrina;
	<i>PO</i> para "per os" (por vía oral);
	<i>PPDC</i> para célula derivada posparto;
45	<i>Rantes</i> (o <i>RANTES</i>) para expresada y secretada por el linfocito T normal en función de su grado de activación;
	<i>rb</i> para conejo
	<i>rh</i> para recombinante;
	<i>SC</i> para por vía subcutánea;
50	<i>SCID</i> para inmunodeficiencia combinada grave;
	<i>SDF-1 alfa</i> para factor 1 alfa derivado de células del estroma;
	<i>SHH</i> para Sonic Hedgehog;
	<i>SMA</i> para actina de músculo liso;
	<i>SOP</i> para procedimiento normalizado de trabajo;
55	<i>TARC</i> para quimiocina regulada por el timo y por activación;
	<i>TCP</i> para plástico para cultivo tisular;
	<i>TGFbeta2</i> para factor de crecimiento transformante beta 2;
	<i>TGFbeta-3</i> para factor de crecimiento transformante beta 3;
	<i>TIMP1</i> para inhibidor tisular de metaloproteinasas de matriz 1;
60	<i>TPO</i> para trombopoyetina;
	<i>TuJ1</i> para BIII tubulina;
	<i>UDC</i> para célula derivada de cordón umbilical;
	<i>VEGF</i> para factor de crecimiento del endotelio vascular;
	<i>vWF</i> para factor de von Willebrand; y
65	<i>alfaFP</i> para alfa-fetoproteína.

Descripción

En un aspecto, la invención proporciona células derivadas de la placenta (PDC) derivadas de tejido placentario exento de sangre. Las placentas de las que se derivan las células son placentas posparto. Las células pueden autorrenovarse y expandirse en cultivo. Las células derivadas de la placenta tienen el potencial de diferenciarse a células de otros fenotipos. En formas de realización preferentes, las células pueden diferenciarse a una célula de origen ectodérmico, mesodérmico o endodérmico. Las células se aíslan a partir de tejidos placentarios, en vez de a partir de sangre de la placenta.

Las células se han caracterizado con respecto a varias de sus propiedades celulares, genéticas, inmunitarias y bioquímicas. Por ejemplo, las células se han caracterizado por su crecimiento, por sus marcadores de superficie celular, por su expresión génica, por su capacidad para producir determinados factores tróficos bioquímicos, y por sus propiedades inmunitarias.

Derivación y expansión de células derivadas de la placenta (PDC)

Según los métodos descritos en el presente documento, se recupera una placenta de mamífero después o poco después de finalizar una gestación a término o una gestación prematura, por ejemplo, después de su expulsión tras el nacimiento. Puede obtenerse tejido placentario de cualquier gestación finalizada, a término o prematura, ya sea un parto vaginal, o por otros medios, por ejemplo, una cesárea. La placenta puede transportarse del lugar de nacimiento a un laboratorio en un recipiente estéril, tal como un matraz, vaso de precipitados, placa de cultivo o bolsa. El recipiente puede contener una solución o medio, incluido pero no limitado a una solución salina, tal como, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) o solución salina tamponada con fosfato (PBS), o cualquier solución utilizada para el transporte de órganos utilizados para el trasplante, tal como la solución de la Universidad de Wisconsin o solución perfluoroquímica. Pueden añadirse al medio o tampón uno o más antibióticos y/o antimicóticos, tales como, pero sin limitarse a, penicilina, estreptomina, anfotericina B, gentamicina y nistatina. La placenta puede aclararse con una solución anticoagulante tal como una solución que contenga heparina. Es preferente mantener el tejido a aproximadamente 4°C-10°C antes de extraer las PDC. Es aún más preferente no haber congelado el tejido antes de extraer las PDC.

El aislamiento de las PDC se produce preferentemente en un ambiente aséptico. Se separa el cordón umbilical de la placenta por medios conocidos en la técnica. El tejido placentario se deja sustancialmente exento de sangre y residuos antes de la derivación de las PDC. Por ejemplo, el tejido placentario puede lavarse con una solución tampón, tal como pero no limitada a, solución salina tamponada con fosfato. El tampón de lavado puede comprender también uno o más antimicóticos y/o antibióticos, tales como, pero no limitados a, penicilina, estreptomina, anfotericina B, gentamicina y nistatina.

En algunos aspectos de la invención, los diferentes tipos de células presentes en el tejido posparto se fraccionan en subpoblaciones a partir de las que pueden aislarse las PDC. Esto puede lograrse utilizando técnicas de separación de células incluidas, pero no limitadas a, tratamiento enzimático para disociar el tejido posparto en sus células componentes, seguido de clonación y selección de tipos específicos de células, por ejemplo, pero no limitada a, la selección en base a marcadores morfológicos y/o bioquímicos; crecimiento selectivo de células deseadas (selección positiva), destrucción selectiva de células no deseadas (selección negativa); separación en base a la aglutinabilidad celular diferencial en la población mixta como, por ejemplo, con aglutinina de soja; procedimientos de congelación y descongelación; propiedades de adherencia diferencial de las células en la población mixta; filtración; centrifugación convencional y zonal; decantación centrífuga (centrifugación contracorriente); separación a gravedad unitaria; distribución en contracorriente; electroforesis; y citometría de flujo, por ejemplo, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

En una forma de realización preferente, el tejido placentario que comprende una placenta completa o un fragmento o sección de la misma se desagrega mediante fuerza mecánica (trituration o fuerzas de cizallamiento), digestión enzimática con enzimas proteolíticas individuales o en combinación, tal como una metaloproteasa de matriz y/o una proteasa neutra, por ejemplo, colagenasa, tripsina, dispasa, LIBERASE (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN), hialuronidasa y/o pepsina, o una combinación de métodos mecánicos y enzimáticos. Por ejemplo, el componente celular del tejido placentario puede desagregarse mediante métodos que utilizan la disociación con colagenasa. La colagenasa puede ser de tipo 1, 2, 3 ó 4. Los métodos de digestión enzimática emplean preferentemente una combinación de enzimas, tal como una combinación de una metaloproteasa de matriz y una proteasa neutra, por ejemplo, una combinación de colagenasa y dispasa. Más preferentemente, la digestión enzimática del tejido placentario utiliza una combinación de una metaloproteasa de matriz, una proteasa neutra y una enzima mucolítica para la digestión del ácido hialurónico, tal como una combinación de colagenasa, dispasa y hialuronidasa o una combinación de LIBERASE (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN) y hialuronidasa. Otras enzimas conocidas en la técnica para el aislamiento de células incluyen papaína, desoxirribonucleasas, serín-proteasas, tales como tripsina, quimotripsina o elastasa, que pueden utilizarse ya sea solas o en combinación con otras enzimas tales como metaloproteasas de matriz, enzimas mucolíticas y proteasas neutras. Las serín-proteasas se utilizan preferentemente consecutivamente al uso de otras enzimas. Resultan especialmente importantes la temperatura y el período de tiempo que los tejidos o las células están en contacto con las serín-proteasas. Las serín-proteasas pueden ser inhibidas por la alfa 2 microglobulina en suero y, por tanto, el medio utilizado para la digestión

suele carecer de suero. En los procedimientos de digestión enzimática se utilizan comúnmente EDTA y ADNasa para aumentar la eficacia de la recuperación de células. El grado de dilución de la digestión también puede influir en gran medida al rendimiento celular ya que las células pueden quedar atrapadas dentro del producto digerido viscoso.

5 En algunas formas de realización de la invención, el tejido placentario se separa en dos o más secciones, consistiendo cada sección en el aspecto neonatal, en el neonatal y el materno, o en el materno. A continuación, las secciones separadas se disocian mediante disociación mecánica y/o enzimática según los métodos descritos en el presente documento. Las células de linaje materno o neonatal pueden identificarse mediante cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo, mediante análisis del cariotipo o hibridación *in situ* para un cromosoma Y.
10 También puede utilizarse el análisis del cariotipo para identificar las células de cariotipo normal.

Pueden utilizarse células aisladas o tejido placentario a partir del que se multiplican las PDC para iniciar, o sembrar, cultivos celulares. Las células se transfieren a recipientes estériles para cultivo tisular recubiertos o no recubiertos con una matriz extracelular o ligandos tales como laminina, colágeno (por ejemplo, natural o desnaturalizado), gelatina, fibronectina, ornitina, vitronectina, y proteína de membrana extracelular (por ejemplo, MATRIGEL (BD Discovery Labware, Bedford, MA)). Las PDC se cultivan en cualquier medio de cultivo capaz de sustentar el crecimiento de las células tales como, pero no limitados a, DMEM (con alto o bajo contenido de glucosa), medio basal de Eagle, medio F10 de Ham (F10), medio F-12 de Ham (F12), medio de Dulbecco modificado por Iscove, medio Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (MSCGM), medio L-15 de Liebovitz, MCDB, DMEM/F12, RPMI 1640, Advanced DMEM (Gibco), DMEM/MCDB201 (Sigma) y CELL-GRO FREE. El medio de cultivo puede complementarse con uno o más componentes incluidos, por ejemplo, suero (por ejemplo, suero bovino fetal (FBS), preferentemente aproximadamente al 2%-15% (v/v); suero equino (ES); suero humano (HS)); beta-mercaptoetanol (BME), preferentemente aproximadamente al 0,001% (v/v); uno o más factores de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento plaquetario (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento insulinoide 1 (IGF-1), factor inhibidor de la leucemia (LIF), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), y eritropoyetina (EPO); aminoácidos, incluida L-valina; y uno o más antibióticos y/o antimicóticos para controlar la contaminación microbiana, tales como, por ejemplo, penicilina G, sulfato de estreptomicina, anfotericina B, gentamicina y nistatina, ya sea solos o en combinación. El medio de cultivo comprende preferentemente Medio de crecimiento (DMEM con bajo contenido de glucosa, suero, BME, un antimicótico y un antibiótico).
15
20
25
30

Las células se siembran en recipientes de cultivo a una densidad que permita el crecimiento celular. Por ejemplo, las células pueden sembrarse entre baja densidad (por ejemplo, de aproximadamente 1.000 células/cm² a aproximadamente 5.000 células/cm²) y densidad elevada (por ejemplo, aproximadamente 50.000 células/cm² o más). En una forma de realización preferente, las células se cultivan a una concentración de CO₂ en el aire de aproximadamente un 0 a aproximadamente un 5 por ciento en volumen. En algunas formas de realización preferentes, las células se cultivan a una concentración de O₂ en el aire de aproximadamente un 2 a aproximadamente un 25 por ciento, preferentemente de aproximadamente un 5 a aproximadamente un 20 por ciento de O₂ en el aire. Las células se cultivan preferentemente a una temperatura de aproximadamente 25°C a aproximadamente 40°C, más preferentemente de aproximadamente 35°C a aproximadamente 39°C, y más preferentemente se cultivan a 37°C. Las células se cultivan preferentemente en una incubadora. El medio en el recipiente de cultivo puede ser estático o agitado, por ejemplo, utilizando un biorreactor. Las PDC se cultivan preferentemente en condiciones de bajo estrés oxidativo (por ejemplo, con la adición de glutatión, ácido ascórbico, catalasa, tocoferol, N-acetilcisteína). "Bajo estrés oxidativo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a condiciones de daño mínimo o nulo por radicales libres a las células cultivadas.
35
40
45

Los métodos para seleccionar el medio de cultivo más apropiado, la preparación del medio y las técnicas de cultivo celular son bien conocidos en la técnica y se describen en diversas fuentes, incluidas Doyle *et al.*, (eds.), 1995, CELL & TISSUE CULTURE: LABORATORY PROCEDURES, John Wiley & Sons, Chichester; y Ho y Wang (eds.), 1991, ANIMAL CELL BIOREACTORS, Butterworth-Heinemann, Boston.
50

El medio de cultivo se cambia según sea necesario, por ejemplo, mediante aspiración cuidadosa del medio de la placa, por ejemplo, con una pipeta, y la reposición con medio recién preparado. Se continúa incubando hasta que se acumula un número o densidad suficiente de células en la placa. Las secciones de tejido explantado original pueden sacarse y las células restantes tripsinizarse utilizando técnicas convencionales o utilizando un rascador de células. Después de la tripsinización, se recogen las células, se llevan a un medio recién preparado y se incuban como se ha indicado anteriormente. En algunas formas de realización, el medio se cambia al menos una vez aproximadamente 24 horas después de la tripsinización para eliminar las células flotantes. Se considera que las células que permanecen en el cultivo son PDC.
55
60

Después de cultivar las células o los fragmentos de tejido durante un período de tiempo suficiente, las PDC se habrán multiplicado, ya sea como resultado de la migración desde el tejido placentario o la división celular, o ambos. En algunas formas de realización de la invención, las PDC se someten a pases, o se llevan a un recipiente de cultivo separado que contiene medio recién preparado del mismo o diferente tipo que el utilizado inicialmente, en el que la población de células puede expandirse por mitosis. Las PDC se someten a pases preferentemente hasta aproximadamente el 100% de confluencia, más preferentemente de aproximadamente un 70% a aproximadamente
65

un 85% de confluencia. Un experto en la materia entiende el límite inferior de confluencia para el pase. Las células de la invención pueden utilizarse en cualquier momento entre el pase 0 y la senescencia. Preferentemente, las células se someten a pases entre aproximadamente 3 y aproximadamente 25 veces, más preferentemente se someten a pases de aproximadamente 4 a aproximadamente 12 veces, y preferentemente se someten a pases 10 u 11 veces. Pueden realizarse la clonación y/o subclonación para confirmar que se ha aislado una población clonal de células.

Las células de la invención pueden crioconservarse. Las PDC se crioconservan preferentemente en un medio de crioconservación, por ejemplo, un medio de cultivo incluido, pero no limitado a, Medio de crecimiento, o un medio de congelación celular, por ejemplo un medio de congelación celular disponible en el mercado tal como, pero no limitado a, C2695 (Sigma), C2639 (Sigma) o C6039 (Sigma). El medio de crioconservación comprende preferentemente dimetilsulfóxido (DMSO), por ejemplo aproximadamente al 10% (v/v). El medio de crioconservación puede comprender agentes de crioconservación adicionales, incluidos pero no limitados a metilcelulosa y/o glicerol. Las células se enfrían preferentemente a aproximadamente 1°C/min. La temperatura de crioconservación preferente es de aproximadamente -80°C a aproximadamente -180°C, más preferentemente es de aproximadamente -90°C a aproximadamente -160°C, y lo más preferentemente es de aproximadamente -125°C a aproximadamente -140°C. Las células crioconservadas se transfieren preferentemente a nitrógeno líquido antes descongelarse para su uso. En algunas formas de realización, por ejemplo, una vez que las ampollas han alcanzado aproximadamente -90°C, se transfieren a un área de almacenamiento de nitrógeno líquido. Las células crioconservadas se descongelan preferentemente a una temperatura entre aproximadamente 25°C y aproximadamente 40°C, más preferentemente entre aproximadamente 35°C y aproximadamente 39°C, y más preferentemente de aproximadamente 37°C.

Caracterización de las PDC

Las PDC pueden caracterizarse, por ejemplo, por sus características de crecimiento (por ejemplo, capacidad de duplicación de la población, tiempo de duplicación, pases hasta la senescencia), mediante análisis del cariotipo (por ejemplo, linaje materno o neonatal), citometría de flujo (por ejemplo, análisis FACS), inmunohistoquímica y/o inmunocitoquímica (por ejemplo, para la detección de epítomos incluidos, pero no limitados a, vimentina, desmina, alfa actina de músculo liso, citoqueratina 18, factor de von Willebrand, CD34, GROalfa, GCP-2, receptor de lipoproteína de baja densidad oxidada 1, y NOGO-A), perfiles de expresión génica (por ejemplo, matrices génicas; reacción en cadena de la polimerasa (por ejemplo, PCR con transcriptasa inversa, PCR en tiempo real y PCR convencional)), matrices de proteínas, secreción de proteínas (por ejemplo, ensayo de coagulación de plasma o análisis de medio acondicionado de PDC, por ejemplo, mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)), análisis de anticuerpos (por ejemplo, ELISA, tinción de anticuerpos para marcadores de superficie celular incluidos, pero no limitados a, CD10, CD13, CD31, CD34, CD44, CD45, CD73, CD80, CD86, CD90, CD117, CD141, CD178, receptor del factor de crecimiento plaquetario alfa (PDGFr-alfa), antígenos HLA de clase I (HLA-A, HLA-B, HLA-C), antígenos HLA de clase II (HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR), B7-H2, y PD-L2), reacción linfocitaria mixta (por ejemplo, como medida de la estimulación de las células mononucleares de sangre periférica alogénicas (PBMC), por ejemplo, linfocitos alogénicos, por ejemplo, linfocitos T CD4+ vírgenes), u otros métodos conocidos en la técnica.

Las células derivadas de la placenta de la invención se derivan preferentemente de tejido placentario posparto humano exento de sangre. Las PDC pueden autorrenovarse y expandirse en cultivo y tienen el potencial de diferenciarse a células de otro fenotipo. Las PDC necesitan L-valina para crecer. Preferentemente, las PDC pueden crecer en una concentración de oxígeno de aproximadamente un 5% a aproximadamente un 20%. Las PDC de la divulgación comprenden preferentemente al menos una de las siguientes características:

(a) producción de al menos uno de entre factor tisular, vimentina, proteína quimiotáctica para granulocitos 2 (GCP-2) y alfa actina de músculo liso;

(b) ausencia de producción de al menos uno de entre GRO-alfa y el receptor de lipoproteína de baja densidad oxidada, detectado mediante citometría de flujo;

(c) producción de al menos uno de entre CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, PD-L2 y HLA-A,B,C;

(d) ausencia de producción de al menos uno de entre CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G, y HLA-DP,DQ,DR, detectado mediante citometría de flujo;

(e) expresión, que en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, está aumentada para al menos uno de entre miembro A2 de la superfamilia de lectinas tipo C, tumor de Wilms 1, miembro A2 de la familia de aldehído deshidrogenasa 1, renina, receptor de lipoproteína de baja densidad oxidada 1, proteína quinasa C zeta, clon IMAGE:4179671, proteína hipotética DKFZp564F013, regulada por disminución en el cáncer de ovario 1 y clon DKFZp547K1113;

(f) expresión, que en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, está reducida para al menos uno de entre: caja homeótica de la baja

estatura 2; proteína 2 de choque térmico de 27 kDa; ligando 12 de quimiocina (motivo C-X-C) (factor derivado de células del estroma 1); elastina; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); caja homeótica de mesénquima 2; homólogo 1 de caja homeótica de "sine oculis"; cristalina, alfa B; activador de morfogénesis asociado a "dishevelled" 2; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralin 1; tetranectina; dominio 3 de homología con src (SH3) y rico en cisteínas; gen 1 de translocación de linfocitos B, antiproliferativa; colesterol 25-hidroxilasa; factor de transcripción relacionado con el enanismo 3; proteína hipotética FLJ23191; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de la procolágeno C-endopeptidasa; homólogo de "frizzeld" 7; gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C; proteína 5 de caja homeótica de "iroquois"; hefaestina; integrina, beta 8; glicoproteína de vesícula sináptica 2; ADNc FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor similar al receptor de citocinas 1; canal de potasio activado por calcio de conductancia intermedia/baja, subfamilia N, miembro 4; integrina, alfa 7; proteína DKFZP586L151; coactivador de la transcripción con motivo de unión a PDZ (TAZ); homólogo 2 de caja homeótica de "sine oculis"; proteína KIAA1034; respuesta de crecimiento precoz 3; caja homeótica de "distal-less" 5; proteína hipotética FLJ20373; familia 1 de aldo-ceto reductasa, miembro C3 (3-alfa hidroxisteroide deshidrogenasa, tipo II); biglicano; fibronectina 1; proencefalina; integrina, tipo beta 1 (con dominios de repetición tipo EGF); clon de ADNc EUROIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor del péptido natriurético C/guanilato ciclasa C (receptor de péptido natriurético atrial C); proteína hipotética FLJ14054; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222); proteína de membrana asociada a vesículas 5; proteína de matriz extracelular tipo fibulina que contiene EGF 1; similar a proteína 3 de interacción con BCL2/adenovirus E1B de 19 kDa; proteína 1 de unión a AE; polipéptido 1 de la subunidad VIIa de la citocromo c oxidasa (músculo); neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; y proteína de unión a factor de crecimiento insulinoide 2, 36 kDa;

(g) secreción de al menos una de entre proteína quimiotáctica para monocitos 1 (MCP-1), interleucina-6 (IL-6), factor 1 alfa derivado de células del estroma (SDF-1 alfa), interleucina 8 (IL-8), proteína quimiotáctica para granulocitos 2 (GCP-2), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), inhibidor tisular de la metaloproteínasa de matriz 1 (TIMP1), trombopoyetina (TPO), proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP1a), Rantes (expresada y secretada por el linfocito T normal en función de su grado de activación), quimiocina regulada por el timo y por activación (TARC), y eotaxina;

(h) ausencia de secreción de al menos uno de entre factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), angiopoyetina 2 (ANG2), factor de crecimiento plaquetario (PDGF-bb), factor de crecimiento transformante beta 2 (TGFbeta2), proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (MIP1b), I309, y quimiocina derivada de macrófagos (MDC), detectado mediante ELISA; y

(i) la capacidad de experimentar al menos 40 duplicaciones de la población en cultivo.

La duplicación de la población puede calcularse como $[\ln(\text{células iniciales}/\text{células finales})/\ln 2]$. El tiempo de duplicación puede calcularse como (tiempo en cultivo (h)/duplicación de la población).

En formas de realización preferentes de la divulgación, la célula comprende dos o más de las características precedentes. Son más preferentes las células que comprenden tres, cuatro, o cinco o más de las características. Son aún más preferentes las células derivadas posparto que comprenden seis, siete, u ocho o más de las características. Son aún más preferentes las células que comprenden las nueve características que se reivindican.

Son también actualmente preferentes las células que producen al menos dos de entre GCP-2, factor tisular, vimentina y alfa actina de músculo liso. Son más preferentes las células que producen tres o cuatro de las proteínas GCP-2, factor tisular, vimentina y alfa actina de músculo liso.

En algunas formas de realización, las células de la invención no producen al menos una de entre receptor de lipoproteína de baja densidad oxidada o GRO-alfa, detectado mediante análisis FACS. En algunas formas de realización, las células no producen ninguna de ellas, detectado mediante análisis FACS.

El experto en la materia entenderá que los marcadores celulares están sujetos a cierta variación en condiciones de crecimiento muy diferentes, y que en general en el presente documento se describen caracterizaciones en Medio de crecimiento, o variaciones del mismo. Son PPDC preferentes de la divulgación las células derivadas posparto que producen al menos uno, dos, tres, o cuatro de entre CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, PD-L2 y HLA-A,B,C. Son más preferentes las células que producen cinco, seis o siete de estos marcadores de superficie celular. Son aún más preferentes las células derivadas posparto que pueden producir las ocho proteínas marcadoras de superficie celular precedentes.

Son PPDC preferentes de la divulgación las PPDC que carecen de producción de al menos una, dos, tres, cuatro de las proteínas CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G y HLA-DR,DP,DQ, detectado mediante citometría de flujo. Son preferentes las PPDC que carecen de producción de al menos cinco, seis, siete u ocho o más de estos marcadores. Son más preferentes las células que carecen de producción de al

menos nueve o diez de los marcadores de superficie celular. Las más preferentes son las células que carecen de producción de once, doce o trece de las proteínas de identificación precedentes.

5 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 y HLA-DR,DP,DQ, detectado mediante citometría de flujo.

10 Resulta preferente que las células derivadas posparto presenten una expresión aumentada, en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal o una célula de médula ósea de cresta iliaca, para al menos uno, dos o tres de entre miembro A2 de la superfamilia de lectinas tipo C, tumor de Wilms 1, miembro A2 de la familia de aldehído deshidrogenasa 1, renina, receptor de lipoproteína de baja densidad oxidada 1, proteína quinasa C zeta, clon IMAGE:4179671, proteína hipotética DKFZ p564F013, regulada por disminución en el cáncer de ovario 1, y clon DKFZp547K1113. Son más preferentes las células que presentan expresión aumentada de cuatro, cinco, seis o siete, y son aún más preferentes las células capaces de expresión aumentada de ocho, 15 nueve o diez de los genes precedentes.

20 Para algunas formas de realización, son preferentes las células, que en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal o una célula de médula ósea de cresta iliaca, tienen expresión reducida de al menos uno de los genes correspondientes a: caja homeótica de la baja estatura 2; proteína 2 de choque térmico de 27 kDa; ligando 12 de quimiocina (motivo C-X-C) (factor derivado de células del estroma 1); elastina; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); caja homeótica de mesénquima 2; homólogo 1 de caja homeótica de "sine oculis"; cristalina, alfa B; activador de morfogénesis asociado a "dishevelled" 2; proteína DKFZp586B2420; similar a neuralin 1; tetranectina; dominio 3 de homología con src (SH3) y rico en cisteínas; gen 1 de translocación de linfocitos B, antiproliferativa; colesterol 25-hidroxilasa; factor de transcripción relacionado con el enanismo 3; proteína hipotética FLJ23191; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de la procolágeno C-endopeptidasa; homólogo de "frizzeld" 7; gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C; proteína 5 de caja homeótica de "iroquois"; hefaestina; integrina, beta 8; glicoproteína de vesícula sináptica 2; ADNc FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor similar al receptor de citocinas 1; canal de potasio activado por calcio de conductancia intermedia/baja, subfamilia N, miembro 4; integrina, alfa 7; proteína DKFZp586L151; coactivador de la transcripción con motivo de unión a PDZ (TAZ); homólogo 2 de caja homeótica de "sine oculis"; proteína KIAA1034; respuesta de crecimiento precoz 3; caja homeótica de "distal-less" 5; proteína hipotética FLJ20373; familia 1 de aldeto reductasa, miembro C3 (3-alfa hidroxiesteroide deshidrogenasa, tipo II); biglicano; fibronectina 1; proencefalina; integrina, tipo beta 1 (con dominios de repetición tipo EGF); clon de ADNc EUROIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor del péptido natriurético C/guanilato ciclasa C (receptor de péptido natriurético atrial C); proteína 35 hipotética FLJ14054; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222); proteína de membrana asociada a vesículas 5; proteína de matriz extracelular tipo fibulina que contiene EGF 1; similar a proteína 3 de interacción con BCL2/adenovirus E1B de 19 kDa; proteína 1 de unión a AE; polipéptido 1 de la subunidad VIIa de la citocromo c oxidasa (músculo); neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; y proteína de unión a factor de crecimiento insulinoide 2, 36 kDa. Son más preferentes las células que tienen, en relación con los fibroblastos humanos, las células madre mesenquimales o las células de médula ósea de la cresta iliaca, expresión reducida de al menos 5, 10, 15 ó 20 genes que corresponden a los enumerados anteriormente. Son actualmente más preferentes las células con expresión relativa reducida de al menos 25, 30 ó 35 de los genes correspondientes a las secuencias enumeradas. También son más preferentes las células derivadas posparto con una expresión que está reducida, en relación con la de un fibroblasto humano, una célula madre mesenquimal o una célula de médula ósea de cresta iliaca, de los genes correspondientes a 35 o más, 40 o más, o incluso todas las secuencias enumeradas. 45

50 La secreción de determinados factores de crecimiento y otras proteínas celulares puede hacer que las células de la invención sean particularmente útiles. Las células derivadas de la placenta preferentes secretan al menos una, dos, tres o cuatro de entre proteína quimiotáctica para monocitos 1 (MCP-1), interleucina-6 (IL-6), factor 1 alfa derivado de células del estroma (SDF-1 alfa), interleucina 8 (IL-8), proteína quimiotáctica para granulocitos 2 (GCP-2), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), inhibidor tisular de la metaloproteinasas de matriz 1 (TIMP1), trombopoyetina (TPO), proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP1a), Rantes (expresada y secretada por el linfocito T normal en función de su grado de activación), quimiocina regulada por el timo y por activación (TARC), y eotaxina. Las células que secretan más de cinco, seis, siete u ocho de las proteínas enumeradas son también útiles y preferentes. Son más preferentes las células que pueden secretar al menos nueve, diez, once o más de los factores, como lo son las células que pueden secretar doce, trece o catorce, o incluso todas las proteínas en la lista precedente.

60 Aunque la secreción de tales factores es útil, las PDC también pueden caracterizarse por su ausencia de secreción de factores en el medio. Resultan preferentes para el uso las células derivadas posparto que carecen de secreción de al menos uno, dos, tres o cuatro de entre factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), angiopoyetina 2 (ANG2), factor de crecimiento plaquetario (PDGF-bb), factor de crecimiento transformante beta 2 (TGFbeta2), proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (MIP1b), I309, y quimiocina derivada de macrófagos (MDC), detectado mediante ELISA. Son más preferentes las células que se 65

caracterizan por su ausencia de secreción de cinco, seis o siete de las proteínas precedentes. También resultan preferentes las células que carecen de secreción de todos los factores enumerados anteriormente.

Los ejemplos de células derivadas de la placenta de la invención se depositaron en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA) y se les asignaron números de registro ATCC de la siguiente manera: (1) la denominación de cepa PLA 071003 (P8) se depositó el 15 de junio de 2004 y se le asignó el número de registro PTA-6074; (2) la denominación de cepa PLA 071003 (P11) se depositó el 15 de junio de 2004 y se le asignó el número de registro PTA-6075; y (3) la denominación de cepa PLA 071003 (P16) se depositó el 16 de junio de 2004 y se le asignó el número de registro PTA-6079.

Los ejemplos de células derivadas de cordón umbilical de la divulgación se depositaron en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA) el 10 de junio de 2004, y se les asignaron los números de registro ATCC de la siguiente manera: (1) a la denominación de cepa UMB 022803 (P7) se le asignó el número de registro PTA-6067; y (2) a la denominación de cepa UMB 022803 (P17) se le asignó el número de registro PTA-6068.

Las PDC de la invención pueden aislarse. La invención proporciona composiciones de PDC, incluidas poblaciones de PDC. La población es sustancialmente homogénea, es decir, comprende sustancialmente sólo PPDC (preferentemente al menos aproximadamente un 96%, 97%, 98%, 99% o más de PPDC). La población homogénea de células de la invención puede comprender células derivadas de la placenta neonatales o células derivadas de la placenta maternas. La homogeneidad de una población de células puede conseguirse mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, mediante clasificación de células (por ejemplo, citometría de flujo), separación con perlas o mediante expansión clonal.

Puede inducirse a las células de la invención a diferenciarse a células de fenotipo o linaje mesodérmico, ectodérmico o endodérmico.

Cultivo de PDC en un medio condrogénico

Puede inducirse a las PDC a diferenciarse a un linaje condrogénico sometiéndolas a condiciones de cultivo celular que inducen la diferenciación. En algunas formas de realización, puede inducirse a las PDC a diferenciarse a un linaje condrogénico, por ejemplo, poniendo en contacto las PDC con factores de crecimiento exógenos específicos (por ejemplo, en cultivo), tales como, por ejemplo, uno o más de entre GDF-5 o factor de crecimiento transformante beta 3 (TGF-beta3), con o sin ascorbato.

El medio condrogénico preferente se complementa con un antibiótico, aminoácidos incluidos prolina y glutamina, piruvato sódico, dexametasona, ácido ascórbico e insulina/transferrina/selenio. El medio condrogénico se complementa preferentemente con hidróxido sódico y/o colágeno. Lo más preferentemente, el medio de cultivo condrogénico se complementa con colágeno. Las células pueden cultivarse a alta o baja densidad. Las células se cultivan preferentemente en ausencia de suero.

La diferenciación condrogénica puede evaluarse, por ejemplo, mediante tinción con safranina-O para la expresión de glicosaminoglicano o tinción con hematoxilina/eosina.

Cultivo de PDC en un medio adipogénico

Puede inducirse a las PDC a diferenciarse a un fenotipo del linaje adipogénico sometiéndolas a condiciones de cultivo celular que inducen la diferenciación. En algunas formas de realización, las PDC se cultivan en un medio definido para inducir la diferenciación a un linaje adipogénico. Los ejemplos de medios adipogénicos incluyen, pero no se limitan a, medios que contienen uno o más glucocorticoides (por ejemplo, dexametasona, indometasona, hidrocortisona, cortisona), insulina, un compuesto que eleva los niveles intracelulares de AMPc (por ejemplo, dibutilil-AMPc; 8-CPT-AMPc (8-(4)clorofeniltio)-adenosina, 3',5'-monofosfato cíclico); 8-bromo-AMPc; dioctanoilo-AMPc; forskolina) y/o un compuesto que inhibe la degradación del AMPc (por ejemplo, un inhibidor de la fosfodiesterasa tal como isobutilmetilxantina (IBMX), metil isobutilxantina, teofilina, cafeína, indometacina), y suero.

La adipogénesis puede evaluarse mediante tinción con Oil-Red-O para determinar la presencia de la formación de gotitas lipídicas o mediante la detección de la expresión de PPAR gamma o leptina.

Cultivo de PDC en un medio osteogénico

Puede inducirse a las PDC a diferenciarse a un fenotipo del linaje osteogénico sometiéndolas a condiciones de cultivo celular que inducen la diferenciación. En algunas formas de realización, las PDC se cultivan en un medio osteogénico tal como, pero no limitado a, medios (por ejemplo, DMEM con bajo contenido de glucosa) que contienen dexametasona entre aproximadamente 10^{-7} molar y aproximadamente 10^{-9} molar en combinación con sal de ascorbato fosfato de aproximadamente 10 micromolar a aproximadamente 50 micromolar (por ejemplo, ascorbato-2-fosfato) y beta-glicerofosfato entre aproximadamente 10 nanomolar y aproximadamente 10 milimolar. El medio

incluye preferentemente suero (por ejemplo, suero bovino, suero de caballo). El medio osteogénico también puede comprender uno o más antibióticos/antimicóticos. El medio osteogénico se complementa preferentemente con factor de crecimiento transformante beta (por ejemplo, TGF-beta1) y/o proteína morfogénica ósea (por ejemplo, BMP-2, BMP-4, o una combinación de las mismas; lo más preferentemente BMP-4)

5 Las células pueden analizarse para un fenotipo osteogénico mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, tinción de von Kossa o mediante detección de marcadores osteogénicos tales como osteocalcina, sialoproteína ósea o fosfatasa alcalina.

10 Cultivo de PDC en medio neurogénico

15 Puede inducirse a las PDC a diferenciarse a un fenotipo del linaje neural sometiendo a condiciones de cultivo celular que inducen la diferenciación. Esto puede lograrse mediante uno o más métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, como se ejemplifica en el presente documento, las PDC pueden cultivarse en un medio neurogénico tal como una composición de DMEM/F12 sin suero que contiene hidroxianisol butilado, cloruro potásico, insulina, forskolina, ácido valproico e hidrocortisona.

20 Como alternativa, las PDC pueden sembrarse en matraces recubiertos con laminina en medio Neurobasal-A (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contiene B27 (complemento B27, Invitrogen), L-glutamina y penicilina/estreptomina, la combinación de los cuales se denomina en el presente documento medio de expansión de progenitoras neurales (NPE). El medio NPE puede completarse adicionalmente con bFGF y/o EGF.

25 Como alternativa, puede inducirse a las PDC a diferenciarse *in vitro* (1) cocultivando las PDC con células progenitoras neurales, o (2) haciendo crecer las PDC en medio acondicionado de células progenitoras neurales.

30 La diferenciación de las PDC a un linaje neurogénico puede demostrarse por una morfología celular bipolar con procesos alargados. Las poblaciones de células inducidas pueden mostrar tinción positiva para la presencia de nestina. Las PDC diferenciadas pueden evaluarse mediante la detección de nestina, TuJ1 (BIII tubulina), GFAP, tirosina hidroxilasa, O4, GABA, y proteína básica de la mielina (MBP). En algunas formas de realización, las PDC tienen la capacidad de formar cuerpos tridimensionales característicos de la formación de neuroesferas de las células madre neurales.

Evaluación de la diferenciación

35 Puede inducirse a las PDC a diferenciarse a un linaje ectodérmico, endodérmico o mesodérmico. Los métodos para caracterizar las células diferenciadas que se desarrollan a partir de las PDC de la invención incluyen, pero no se limitan a, métodos histológicos, morfológicos, bioquímicos e inmunohistoquímicos, o el uso de marcadores de superficie celular, o genéticamente o molecularmente, o mediante la identificación de factores secretados por la célula diferenciada, y por las cualidades inductoras de las PDC diferenciadas.

40 Métodos de uso de las PDC o componentes o productos de las mismas

Ingeniería genética de las PDC

45 Las células de la invención pueden modificarse por ingeniería genética para que expresen una proteína terapéutica utilizando cualquiera de diversos vectores, incluidos, pero no limitados a, vectores virales integrativos, por ejemplo, vector retrovirus o vectores virales adenoasociados; vectores de replicación no integrativos, por ejemplo, vectores papilomavirus, vectores SV40, vectores adenovirales; o vectores víricos de replicación defectuosa. Otros métodos de introducción de ADN en las células incluyen el uso de liposomas, electroporación, una pistola de partículas, o mediante inyección directa del ADN.

50 Las células hospedadoras se transforman o se transfectan preferentemente con ADN controlado por, o en asociación operativa con, uno o más elementos apropiados de control de la expresión tales como secuencias promotoras o potenciadoras, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, entre otros, y un marcador seleccionable.

55 Después de introducir el ADN extraño, puede dejarse a las células manipuladas crecer en medios enriquecidos y, a continuación, cambiarlas a medios selectivos. El marcador seleccionable en el ADN extraño confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de forma estable el ADN extraño como, por ejemplo, en un plásmido, en sus cromosomas y crezcan para formar focos que, a su vez, pueden clonarse y expandirse en líneas celulares.

60 Este método puede utilizarse ventajosamente para diseñar líneas celulares que expresen el producto génico.

65

Puede utilizarse cualquier promotor para activar la expresión del gen insertado. Por ejemplo, los promotores virales incluyen, pero no se limitan al promotor/potenciador de CMV, promotor del gen de la elastina, SV40, papilomavirus o virus de Epstein-Barr. Preferentemente, los elementos de control utilizados para controlar la expresión del gen de interés deben permitir la expresión regulada del gen de manera que el producto se sintetice sólo cuando sea necesario *in vivo*. Si se desea la expresión transitoria, se utilizan preferentemente promotores constitutivos en un vector no integrativo y/o de replicación defectuosa. Como alternativa, podrían utilizarse promotores inducibles para activar la expresión del gen insertado cuando sea necesario.

Los promotores inducibles incluyen, pero no se limitan a, los asociados con la metalotioneína y las proteínas de choque térmico.

Los ejemplos de regiones de control de la transcripción que presentan especificidad de tejido que se han descrito y pueden utilizarse incluyen pero no se limitan a: región de control del gen de elastasa I, que está activa en las células acinares pancreáticas (Swift *et al.*, 1984, Cell 38:639; Ornitz *et al.*, 1985, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399; MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515); región de control del gen de la insulina, que está activa en las células beta pancreáticas (Hanahan, 1985, Nature 315:115); región de control del gen de la proteína básica de la mielina, que está activa en las células oligodendrocitos del cerebro (Readhead *et al.*, 1987, Cell 48:703); región de control del gen de la cadena ligera de la miosina 2, que está activa en el músculo esquelético (Shani, 1985, Nature 314:283); y la región de control del gen de la hormona liberadora de gonadotropina, que está activa en el hipotálamo (Mason *et al.*, 1986, Science 234:1372).

Las células de la invención pueden modificarse por ingeniería genética para anular ("knock out") o reducir ("knock down") la expresión de factores que promueven la inflamación o el rechazo en el sitio del implante. Más adelante se analizan técnicas de modulación negativa para reducir los niveles de expresión de genes diana o los niveles de actividad del producto génico diana. "Modulación negativa", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una reducción del nivel y/o la actividad del producto génico diana con respecto al nivel y/o la actividad del producto génico diana en ausencia del tratamiento modulador. La expresión de un gen natural de una célula puede reducirse o anularse utilizando varias técnicas incluidas, por ejemplo, la inhibición de la expresión mediante la inactivación del gen completamente (comúnmente denominado "knockout") utilizando la técnica de recombinación homóloga. Normalmente, un exón que codifica una región importante de la proteína (o un exón en dirección 5' respecto a dicha región) es interrumpido por un marcador seleccionable positivo, por ejemplo, neo, evitando la producción de ARNm normal a partir del gen diana y que da como resultado la inactivación del gen. Un gen también puede inactivarse creando una deleción en una parte de un gen o deleccionando todo el gen. Utilizando un constructo con dos regiones de homología con el gen diana que estén muy alejadas en el genoma, pueden deleccionarse las secuencias que se interponen entre las dos regiones (Mombaerts *et al.*, 1991, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 88:3084).

También pueden utilizarse según la invención moléculas antisentido, de ribozima, ADNzimas y ARN pequeño de interferencia que inhiben la expresión del gen diana para reducir el nivel de actividad del gen diana. Por ejemplo, las moléculas de ARN antisentido que inhiben la expresión de los complejos génicos mayores de histocompatibilidad (HLA) han demostrado ser más versátiles con respecto a las respuestas inmunitarias. Aún más, pueden utilizarse moléculas de triple hélice para reducir el nivel de actividad del gen diana.

Estas técnicas se describen detalladamente en L.G. Davis *et al.* (eds.), 1994, BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 2ª ed., Appleton & Lange, Norwalk, Conn.

Mediante cualquiera de las técnicas precedentes, por ejemplo, puede anularse o reducirse la expresión de IL-1 en las células de la invención para reducir la producción de mediadores inflamatorios por las células de la invención. Asimismo, puede anularse o reducirse la expresión de moléculas de MHC de clase II con el fin de reducir el riesgo de rechazo del tejido implantado.

Una vez las células de la invención se han modificado por ingeniería genética, pueden implantarse directamente en el paciente.

Como alternativa, las células modificadas por ingeniería genética pueden utilizarse para producir nuevo tejido *in vitro*, que a continuación se implanta en el sujeto.

Secreción de factores tróficos por las PDC

La secreción de factores de crecimiento por las PDC puede proporcionar soporte trófico para un segundo tipo de célula *in vitro* o *in vivo*. Las PDC pueden secretar, por ejemplo, interleucina 8 (IL-8), factor tisular, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), proteína quimiotáctica para monocitos 1 (MCP-1), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), inhibidor tisular de la metaloproteínasa de matriz 1 (TIMP1), trombopoyetina (TPO), factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF), factor 1 alfa derivado de células del estroma (SDF-1 alfa), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), interleucina-6 (IL-6), proteína quimiotáctica para granulocitos 2 (GCP-2), proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP1a), proteína quimiotáctica para monocitos 1 (MCP-1), Rantes (expresada y secretada por el linfocito T normal en función de su grado de activación), quimiocina regulada

por el timo y por activación (TARC), eotaxina, NGF, NT-3, IL-7, IL-1, SCF, AMPS o cistatina-C en poblaciones sustancialmente homogéneas de células, que puede aumentarse mediante diversas técnicas, incluido el cultivo *ex vivo* de las células en un medio químicamente definido.

5 En algunos aspectos de la invención, una población de PDC sustenta la supervivencia, la proliferación, el crecimiento, el mantenimiento, la maduración, la diferenciación o el aumento de la actividad de las células, incluidas las células madre, pero no las células madre embrionarias humanas, tales como las células madre neurales (NSC), las células madre hematopoyéticas (HPC, particularmente las células madre CD34+), y mezclas de las mismas. En otras formas de realización, la población sustentada por las PDC es sustancialmente homogénea, es decir, comprende sustancialmente sólo PDC (preferentemente al menos aproximadamente un 96%, 97%, 98%, 99% o más de PDC).

Medio acondicionado de las PDC

15 Otra forma de realización de la invención presenta el uso de las PDC para la producción de medio acondicionado, ya sea de PDC indiferenciadas o de PDC incubadas en condiciones que estimulan la diferenciación a un determinado linaje. Se contemplan tales medios acondicionados de la descripción para su uso en el cultivo de células *in vitro* o *ex vivo*, por ejemplo, células madre o progenitoras, o para su uso *in vivo*, por ejemplo, para sustentar las células trasplantadas (por ejemplo, poblaciones homogéneas o heterogéneas de PDC).

Cocultivos de PDC con otros tipos de células

25 Las PDC tienen la capacidad de sustentar la supervivencia, el crecimiento y la diferenciación de otros tipos de células en cocultivo. Por consiguiente, en otra forma de realización, las PDC se cocultivan *in vitro* para proporcionar soporte trófico a otras células. Para el cocultivo, puede ser deseable que las PDC y las otras células deseadas se cocultiven en condiciones en las que los dos tipos de células estén en contacto. Esto puede conseguirse, por ejemplo, sembrando las células como una población heterogénea de células en un medio de cultivo o sobre un sustrato de cultivo adecuado. Como alternativa, las PDC pueden cultivarse primero hasta la confluencia y emplearse como sustrato para el segundo tipo de célula deseada en cultivo. En esta última forma de realización, las células pueden estar además físicamente separadas, por ejemplo, por una membrana o un dispositivo similar, de manera que el otro tipo de célula pueda sacarse y utilizarse por separado después del período de cocultivo. El uso de las PDC en cocultivo para promover la expansión y diferenciación de otros tipos de células puede hallar aplicabilidad en áreas clínicas/terapéuticas y de investigación. Por ejemplo, puede utilizarse el cocultivo de PDC para facilitar el crecimiento y la diferenciación de células de un determinado fenotipo en cultivo, con fines de investigación básica o para su uso en ensayos de selección de fármacos, por ejemplo. El cocultivo de PDC también puede utilizarse para la expansión *ex vivo* de células de un determinado fenotipo para su administración posterior con fines terapéuticos. Por ejemplo, las células pueden recolectarse de un individuo, expandirse *ex vivo* en cocultivo con las PDC, a continuación devolverse a ese individuo (transferencia autóloga) o a otro individuo (transferencia singénica o alogénica). En estas formas de realización, se entenderá que, después de la expansión *ex vivo*, la población mixta de células que comprende las PDC podría administrarse a un paciente que necesita tratamiento. Como alternativa, en situaciones en las que resulta apropiada o deseable la transferencia autóloga, las poblaciones de células cocultivadas pueden separarse físicamente en cultivo, lo que permite sacar las células autólogas para administrarse al paciente.

45 Terapia celular

Como se ha demostrado en el presente documento, las PDC han demostrado ser trasplantadas con eficacia en el cuerpo y suplir la función perdida en modelos animales aceptados para la previsibilidad de la eficacia en seres humanos. Estos resultados apoyan una forma de realización preferente de la invención, en la que las PDC se utilizan en terapia celular para tratar una afección, lesión o enfermedad. Por ejemplo, las PDC de la invención pueden utilizarse para tratar a pacientes que necesitan la reparación o sustitución de un tejido u órgano resultado de una enfermedad o traumatismo o del fallo del tejido para desarrollarse con normalidad, o para proporcionar una función cosmética, tal como para aumentar características corporales. Una vez trasplantadas en un sitio diana en el cuerpo, las propias PDC pueden diferenciarse a uno o más fenotipos, o pueden proporcionar soporte trófico a otros tipos de células *in vivo*, o pueden ejercer un efecto beneficioso de esas dos maneras, entre otros.

Las PDC pueden administrarse en solitario (por ejemplo, como poblaciones sustancialmente homogéneas) o como mezclas con otras células. Las PDC pueden administrarse tal como se formulan en una preparación farmacéutica con una matriz, o con transportadores farmacéuticamente aceptables convencionales. Cuando las PDC se administran con otras células, pueden administrarse simultánea o secuencialmente con las otras células (ya sea antes o después de las otras células). Las células que pueden administrarse junto con las PDC incluyen, pero no se limitan a, otras células multipotentes. Las células de diferentes tipos pueden mezclarse con las PDC inmediatamente o poco antes de la administración, o pueden cocultivarse juntas durante un período de tiempo antes de la administración.

65

Las PDC pueden administrarse con otros fármacos o moléculas biológicas beneficiosas (factores de crecimiento, factores tróficos). Cuando las PDC se administran con otros agentes, pueden administrarse juntos en una sola composición farmacéutica o en composiciones farmacéuticas separadas, de forma simultánea o secuencial con los demás factores bioactivos (ya sea antes o después de la administración de los demás agentes). Los ejemplos de factores bioactivos incluyen agentes antiapoptóticos (por ejemplo, EPO, mimeticuerpo de la EPO, TPO, IGF-I e IGF-II, HGF, inhibidores de caspasa); antiinflamatorios (por ejemplo, inhibidores de p38 MAPK, inhibidores de TGF-beta, estatinas, inhibidores de IL-6 e IL-1, PEMIROLAST, TRANILAST, REMICADE, SIROLIMUS, y AINE (fármacos antiinflamatorios no esteroideos, por ejemplo, TEPOXALIN, TOLMETIN, SUPROFEN); inmunosupresores/inmunomoduladores (por ejemplo, inhibidores de la calcineurina, tales como ciclosporina, tacrolimus; inhibidores de mTOR (por ejemplo, SIROLIMUS, EVEROLIMUS); antiproliferativos (por ejemplo, azatioprina, micofenolato mofetilo), corticosteroides (por ejemplo, prednisolona, hidrocortisona); anticuerpos tales como anticuerpos monoclonales contra el receptor IL-2Ralfa (por ejemplo, basiliximab, daclizumab), anticuerpos policlonales contra linfocitos T (por ejemplo, globulina anti-timocitos (ATG); globulina anti-linfocitos (ALG); anticuerpo monoclonal contra linfocitos T OKT3)); antitrombogénicos (por ejemplo, heparina, derivados de heparina, uroquinasa, PPACK (dextrofenilalanina prolina arginina clorometilcetona), compuestos de antitrombina, antagonistas de receptores plaquetarios, anticuerpos antitrombina, anticuerpos contra receptores plaquetarios, aspirina, dipiridamol, protamina, hirudina, inhibidores de prostaglandinas, e inhibidores de plaquetas); y antioxidantes (por ejemplo, probucol, vitamina A, ácido ascórbico, tocoferol, coenzima Q-10, glutatión, L-cisteína, N-acetilcisteína). Los fármacos que pueden coadministrarse incluyen los anestésicos locales. Como otro ejemplo, las células pueden coadministrarse con el factor inhibidor de cicatrices como se describe en la patente de EE.UU. n° 5.827.735.

En una forma de realización, las PDC se administran como células indiferenciadas, es decir, como se cultivan en Medio de crecimiento. Como alternativa, en una forma de realización de la divulgación, las PDC pueden administrarse después de exponerse en cultivo a condiciones que estimulan la diferenciación hacia un fenotipo deseado.

Las células de la invención pueden implantarse quirúrgicamente, inyectarse, introducirse (por ejemplo, por medio de un catéter o jeringa), o administrarse de otra manera directa o indirectamente al sitio que necesita reparación o aumento. Las vías de administración de las células de la invención o composiciones de las mismas incluyen, pero no se limitan a las vías de administración oral, nasal, intraarterial, parenteral, intravenosa, oftálmica, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intracerebral, intraventricular, intracerebroventricular, intratecal, intracisternal, intraespinal y/o periespinal introduciéndolas mediante agujas intracraneales o intravertebrales y/o catéteres con o sin dispositivos de bombeo.

Cuando las células se administran en dispositivos semisólidos o sólidos, la implantación quirúrgica en un lugar preciso del cuerpo es por lo general un medio adecuado de administración. Sin embargo, las composiciones farmacéuticas líquidas o fluidas, pueden administrarse a un lugar más general (por ejemplo, por toda una zona difusa afectada), desde el que migran a un lugar concreto por ejemplo, en respuesta a señales químicas.

También se describen componentes celulares (por ejemplo, lisados celulares o componentes de los mismos) o productos (por ejemplo, matriz extracelular, factores tróficos y otros factores biológicos producidos naturalmente por las PDC o mediante modificación genética, medio acondicionado del cultivo de PDC) de las PDC para su uso en métodos de tratamiento en los que dicho uso comprende la administración de composiciones farmacéuticas que comprenden dichos productos o componentes celulares de PDC. Una vez más, estos métodos pueden comprender adicionalmente la administración de factores bioactivos, tales como agentes antiapoptóticos (por ejemplo, EPO, mimeticuerpo de la EPO, TPO, IGF-I e IGF-II, HGF, inhibidores de caspasas); antiinflamatorios (por ejemplo, inhibidores de p38 MAPK, inhibidores de TGF-beta, estatinas, inhibidores de IL-6 e IL-1, PEMIROLAST, TRANILAST, REMICADE, SIROLIMUS y AINE (fármacos antiinflamatorios no esteroideos, por ejemplo, TEPOXALIN, TOLMETIN, SUPROFEN); inmunosupresores/inmunomoduladores (por ejemplo, inhibidores de la calcineurina, tales como ciclosporina, tacrolimus, inhibidores de mTOR (por ejemplo, SIROLIMUS, EVEROLIMUS); antiproliferativos (por ejemplo, azatioprina, micofenolato mofetilo), corticosteroides (por ejemplo, prednisolona, hidrocortisona); anticuerpos tales como anticuerpos monoclonales contra el receptor IL-2Ralfa (por ejemplo, basiliximab, daclizumab), anticuerpos policlonales contra linfocitos T (por ejemplo, globulina anti-timocitos (ATG); globulina anti-linfocitos (ALG); anticuerpo monoclonal contra linfocitos T OKT3)); antitrombogénicos (por ejemplo, heparina, derivados de heparina, uroquinasa, PPACK (dextrofenilalanina prolina arginina clorometilcetona), compuestos de antitrombina, antagonistas de receptores plaquetarios, anticuerpos anti-trombina, anticuerpos contra receptores plaquetarios, aspirina, dipiridamol, protamina, hirudina, inhibidores de prostaglandinas, e inhibidores de plaquetas); y antioxidantes (por ejemplo, probucol, vitamina A, ácido ascórbico, tocoferol, coenzima Q-10, glutatión, L-cisteína, N-acetilcisteína), anestésicos locales, y factor inhibidor de cicatrices como se describe en la patente de EE.UU. n° 5.827.735.

Las formas farmacéuticas y los regímenes de administración de las PDC o cualquiera de las demás composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se desarrollan según la buena práctica médica, teniendo en cuenta el estado del paciente individual, por ejemplo, la naturaleza y gravedad de la afección que se está tratando, la edad, el sexo, el peso corporal y el cuadro clínico general, y otros factores conocidos por los

médicos. Por lo tanto, la cantidad eficaz de una composición farmacéutica a administrar a un paciente viene determinada por estas consideraciones tal como se conoce en la técnica.

5 En algunas formas de realización de la invención, puede no ser necesario o deseable inmunosuprimir a un paciente antes de iniciar la terapia celular con las PDC. Además, las PDC han demostrado no estimular las PBMC alogénicas (por ejemplo, linfocitos alogénicos, por ejemplo, linfocitos T CD4+ vírgenes) en una reacción linfocitaria mixta. Por consiguiente, en algunos casos puede ser tolerado el trasplante con PDC alogénicas, o incluso xenogénicas.

10 Sin embargo, en otros casos, puede ser deseable o apropiado inmunosuprimir farmacológicamente a un paciente antes de iniciar la terapia celular. Esto puede lograrse mediante el uso de inmunosupresores sistémicos o locales, o puede lograrse administrando las células en un dispositivo encapsulado. Las PDC pueden encapsularse en una cápsula que sea permeable a los nutrientes y al oxígeno que necesita la célula y a los factores terapéuticos que la célula está secretando, pero impermeable a factores humorales inmunitarios y a células. Preferentemente el encapsulante es hipoaérgico, se encuentra con facilidad y de forma estable en un tejido diana, y proporciona una protección adicional a la estructura implantada. En la técnica se conocen estos y otros medios para reducir o eliminar una respuesta inmunitaria contra las células trasplantadas. Como alternativa, las PDC pueden modificarse por ingeniería genética para reducir su inmunogenicidad.

20 Puede determinarse la supervivencia de las PDC trasplantadas en un paciente vivo mediante el uso de diversas técnicas de exploración, por ejemplo, exploraciones mediante tomografía axial computarizada (TAC o TC), resonancia magnética (RM) o tomografía por emisión de positrones (TEP). La determinación de la supervivencia del trasplante también puede realizarse *post mortem* extrayendo el tejido diana y examinándolo visualmente o con un microscopio. Como alternativa, las células pueden tratarse con tinciones que sean específicas para las células de un linaje específico. Las células trasplantadas también pueden identificarse mediante la incorporación previa de colorantes indicadores tales como microesferas marcadas con rodamina o fluoresceína, Fast Blue, bisbenzamida, micropartículas férricas, o productos génicos indicadores introducidos genéticamente, tales como beta-galactosidasa o beta-glucuronidasa.

30 La integración funcional de las PDC trasplantadas en un sujeto puede evaluarse examinando la restauración de la función dañada o afectada, o el aumento de la función.

Composiciones y composiciones farmacéuticas

35 Las composiciones de PDC que comprenden la población de células de la invención quedan incluidas dentro del alcance de la invención. También se describen composiciones de PDC y productos relacionados (por ejemplo, matriz extracelular, lisado, lisado celular, medio acondicionado). Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más factores bioactivos, por ejemplo pero sin limitarse a, un factor de crecimiento, un factor inductor de la diferenciación, un factor de supervivencia celular tal como el inhibidor de caspasas, un antiinflamatorio tal como el inhibidor de la quinasa p38, o un factor angiogénico tal como VEGF o bFGF. Algunos ejemplos de factores bioactivos incluyen PDGF-bb, EGF, bFGF, IGF-1 y LIF. En algunas formas de realización, se cultivan PDC indiferenciadas o inducidas a diferenciarse en contacto con el factor bioactivo. En algunas formas de realización, las PDC indiferenciadas permanecen indiferenciadas tras el contacto con el factor bioactivo. En otras formas de realización, el factor bioactivo induce la diferenciación de las PDC.

45 Las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden comprender poblaciones homogéneas o heterogéneas de PDC diferenciadas, cultivos de las mismas, lisados celulares de las mismas, matriz extracelular producida por las mismas, o medio acondicionado derivado de las mismas en un transportador farmacéuticamente aceptable.

50 Los transportadores farmacéuticamente aceptables para las células de la invención incluyen sustancias transportadoras orgánicas o inorgánicas que no reaccionan de manera perjudicial con las células de la invención o composiciones o componentes de las mismas. En la medida en que sean biocompatibles, los transportadores farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen agua, solución salina (por ejemplo, solución de Ringer), alcoholes, aceites, gelatinas y carbohidratos, tales como lactosa, amilosa o almidón, ésteres de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa, y polivinilpirrolidina. Tales preparaciones pueden esterilizarse, y si se desea, mezclarse con agentes auxiliares tales como lubricantes, conservantes, estabilizadores, humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones y colorantes. En la técnica se conocen transportadores farmacéuticos adecuados para su uso en la presente invención y se describen, por ejemplo, en Pharmaceutical Sciences (17^a ed., Mack Pub. Co., Easton, PA) y en el documento WO 96/05309.

60 La dosificación (por ejemplo, el número de células a administrar) y la frecuencia de administración dependerán de varios factores, incluidos pero no limitados a, la naturaleza de la afección a tratar, la gravedad de los síntomas de la afección, las características del paciente (por ejemplo, la edad, la estatura, el sexo, la salud).

65 **Uso de las PDC para el trasplante**

5 Cuando las PDC de la invención se proporcionan para uso terapéutico, los métodos de tratamiento implican la implantación de las PDC en individuos que lo necesitan. Las células de la presente invención pueden administrarse al sitio con necesidad terapéutica o hacerse "migrar de manera dirigida" al sitio.

10 Las células de la presente invención pueden diferenciarse *in vivo* o proporcionar soporte trófico para células endógenas. La dosificación adecuada de implantación de células en los seres humanos puede determinarse a partir de la información existente en relación con, por ejemplo, la actividad de las células. A partir del cultivo *in vitro* y en experimentos con animales *in vivo*, puede cuantificarse la cantidad de factores producidos. Esta información también es útil para calcular una dosificación apropiada de material implantado. Además, puede hacerse seguimiento del paciente para determinar si puede hacerse una implantación adicional o reducirse el material implantado en consecuencia.

15 Para potenciar la vascularización y la supervivencia de las células trasplantadas, pueden añadirse factores angiogénicos tales como VEGF, PDGF o bFGF ya sea solos o en combinación con células endoteliales o sus precursoras incluidas células CD34+, CD34+/CD117+.

20 Pueden añadirse a las células trasplantadas uno o más de otros componentes, incluidos componentes de la matriz extracelular seleccionados, tales como uno o más tipos de colágeno conocidos en la técnica, y/o factores de crecimiento, plasma rico en plaquetas y fármacos. Como alternativa, las células de la invención pueden modificarse por ingeniería genética para que expresen y produzcan factores de crecimiento. Los factores bioactivos que pueden incorporarse provechosamente en la formulación de células incluyen agentes antiapoptóticos (por ejemplo, EPO, mimeticuerpo de la EPO, TPO, IGF-I e IGFII, HGF, inhibidores de caspasas); antiinflamatorios (por ejemplo, inhibidores de p38 MAPK, inhibidores de TGF-beta, estatinas, inhibidores de IL-6 e IL-1, PEMIROLAST, TRANILAST, REMICADE, SIROLIMUS y AINE (fármacos antiinflamatorios no esteroideos, por ejemplo, TEPOXALIN, TOLMENTIN, SUPROFEN); inmunosupresores/inmunomoduladores (por ejemplo, inhibidores de calcineurina, tales como ciclosporina, tacrolimus; inhibidores de mTOR (por ejemplo, SIROLIMUS, EVEROLIMUS); antiproliferativos (por ejemplo, azatioprina, micofenolato mofetilo); corticosteroides (por ejemplo, prednisolona, hidrocortisona); anticuerpos tales como anticuerpos monoclonales contra receptor IL-2Ralfa (por ejemplo, basiliximab, daclizumab), anticuerpos policlonales contra linfocitos T (por ejemplo, globulina anti-timocitos (ATG); globulina anti-linfocitos (ALG); anticuerpos monoclonales contra linfocitos T OKT3)); antitrombogénicos (por ejemplo, heparina, derivados de heparina, uroquinasa, PPACK (dextrofenilalanina prolina arginina clorometilcetona), compuestos antitrombina, antagonistas de receptores plaquetarios, anticuerpos antitrombina, anticuerpos contra receptores plaquetarios, aspirina, dipyridamol, protamina, hirudina, inhibidores de prostaglandinas e inhibidores de plaquetas); y antioxidantes (por ejemplo, probucol, vitamina A, ácido ascórbico, tocoferol, coenzima Q-10, glutatión, L-cisteína, N-acetilcisteína), así como anestésicos locales. Como otro ejemplo, las células pueden administrarse con un factor inhibidor de cicatrices como se describe en la patente de Estados Unidos nº 5.827.735.

40 **Formulación de las PDC para el trasplante**

45 En una forma de realización no limitativa, se prepara una formulación que comprende las células de la invención para inyectarse directamente al sitio en el que se desea la producción de nuevo tejido. Por ejemplo, y no a modo de limitación, las células de la invención pueden suspenderse en una solución de hidrogel para inyección. Los ejemplos de hidrogeles adecuados para utilizarse en la invención incluyen péptidos de autoensamblaje, tales como RAD16. Como alternativa, puede dejarse endurecer la solución de hidrogel que contiene las células, por ejemplo en un molde, para formar una matriz con células dispersadas en la misma antes de la implantación. O, una vez que la matriz se ha endurecido, pueden cultivarse las formaciones celulares de manera que las células se expandan por mitosis antes de la implantación. El hidrogel es un polímero orgánico (natural o sintético), que se reticula a través de enlaces covalentes, iónicos o de hidrógeno para crear una estructura reticular abierta tridimensional que inmoviliza las moléculas de agua para formar un gel. Los ejemplos de materiales que pueden utilizarse para formar un hidrogel incluyen polisacáridos tales como alginato y sales del mismo, péptidos, polifosfazinas y poliacrilatos, que se reticulan iónicamente, o polímeros de bloque tales como copolímeros de bloque de óxido de polietileno-polipropilenglicol que se reticulan mediante la temperatura o el pH, respectivamente. En algunas formas de realización, el soporte para las PDC de la invención es biodegradable.

55 En algunas formas de realización de la invención, la formulación comprende un gel polimerizable *in situ*, como se describe, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2002/0022676; Anseth *et al.*, J. Control Release, 78(1-3):199-209 (2002); Wang *et al.*, Biomaterials, 24(22):3969-80 (2003).

60 En algunas formas de realización, los polímeros son al menos parcialmente solubles en soluciones acuosas, tales como agua, soluciones salinas tamponadas o soluciones alcohólicas acuosas, que tienen grupos laterales cargados, o una sal iónica monovalente de los mismos. Los ejemplos de polímeros con grupos laterales ácidos que pueden hacerse reaccionar con cationes son poli(fosfacenos), poli(ácidos acrílicos), poli(ácidos metacrílicos), copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, poli(acetato de vinilo) y polímeros sulfonados, tales como poliestireno sulfonado. También pueden utilizarse copolímeros que tienen grupos laterales ácidos formados por reacción de monómeros o polímeros de éter vinílico y ácido acrílico o metacrílico. Los ejemplos de grupos ácidos

son grupos de ácido carboxílico, grupos de ácido sulfónico, grupos de alcohol halogenado (preferentemente fluorado), grupos de OH fenólico y grupos de OH ácido.

5 Los ejemplos de polímeros con grupos laterales básicos que pueden hacerse reaccionar con aniones son poli(vinilaminas), poli(vinil piridina), poli(vinil imidazol), y algunos polifosfacenos sustituidos con imino. También pueden formarse la sal de amonio o cuaternaria de los polímeros a partir de los nitrógenos de la cadena principal o grupos imino colgantes. Los ejemplos de grupos laterales básicos son grupos amino e imino.

10 El alginato puede reticularse iónicamente con cationes divalentes, en agua, a temperatura ambiente, para formar una matriz de hidrogel. Debido a estas condiciones moderadas, el alginato ha sido el polímero más comúnmente utilizado para la encapsulación de células de hibridoma, como se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos nº 4.352.883 concedida a Lim. En el proceso de Lim, se suspende una solución acuosa que contiene los materiales biológicos a encapsular en una solución de un polímero soluble en agua, la suspensión se conforma en gotitas que se configuran en microcápsulas discretas por contacto con cationes multivalentes, a
15 continuación la superficie de las microcápsulas se reticula con poliaminoácidos para formar una membrana semipermeable alrededor de los materiales encapsulados.

20 Los polifosfacenos son polímeros con cadenas principales que consisten en nitrógeno y fósforo separados por enlaces sencillos y dobles alternos. Cada átomo de fósforo está unido covalentemente a dos cadenas laterales.

25 Los polifosfacenos adecuados para la reticulación tienen una mayoría de grupos de cadena lateral que son ácidos y capaces de formar puentes de sal con cationes divalentes o trivalentes. Los ejemplos de grupos laterales ácidos preferentes son grupos de ácido carboxílico y grupos de ácido sulfónico. Los polifosfacenos hidrolíticamente estables están hechos de monómeros que tienen grupos laterales de ácido carboxílico que se reticulan mediante cationes divalentes o trivalentes tales como Ca^{2+} o Al^{3+} . Pueden sintetizarse polímeros que se degraden mediante hidrólisis incorporando monómeros que tengan grupos laterales de glicerol, éster de aminoácido o imidazol. Por ejemplo, puede sintetizarse un poli[bis(carboxilatofenoxi)]fosfaceno (PCPP) polianiónico, que se reticula con cationes multivalentes disueltos en medios acuosos a temperatura ambiente o inferior para formar matrices de hidrogel.

30 Los polifosfacenos biodegradables tienen al menos dos tipos diferentes de cadenas laterales, grupos laterales ácidos capaces de formar puentes de sal con cationes multivalentes, y grupos laterales que se hidrolizan en condiciones *in vivo*, por ejemplo, grupos imidazol, ésteres de aminoácido, glicerol y glucosilo.

35 La hidrólisis de la cadena lateral da como resultado la erosión del polímero. Son ejemplos de cadenas laterales que se hidrolizan los imidizoles sustituidos y no sustituidos y los ésteres de aminoácidos en los que el grupo está unido al átomo de fósforo a través de un enlace amino (los polímeros de polifosfaceno en los que ambos grupos R están fijados de esta manera se conocen como poliaminofosfacenos). Para los poliiimidazolfosfacenos, algunos de los grupos "R" en la cadena principal del polifosfaceno son anillos de imidazol, fijados al fósforo de la cadena principal a través de un átomo de nitrógeno del anillo. Otros grupos "R" pueden ser residuos orgánicos que no participan en la hidrólisis, tales como grupos metil fenoxi u otros grupos que se muestran en el artículo científico de Allcock, *et al.*, *Macromolecule* 10:824 (1977). En la técnica se conocen métodos de síntesis de los materiales de hidrogel, así como métodos para preparar tales hidrogeles.

45 También pueden incluirse en la formulación otros componentes, incluidos pero no limitados a, cualquiera de los siguientes: (1) tampones para proporcionar pH e isotonicidad apropiados; (2) lubricantes; (3) materiales viscosos para retener las células en o cerca del sitio de administración, incluidos, por ejemplo, alginatos, agares y gomas vegetales; y (4) otros tipos de células que pueden producir un efecto deseado en el sitio de administración, tal como, por ejemplo, potenciación o modificación de la formación de tejido o de sus características fisicoquímicas, o como sustento para la viabilidad de las células, o inhibición de la inflamación o el rechazo. Las células pueden cubrirse con un apósito para heridas apropiado para evitar que las células de abandonen el sitio. Los expertos en la materia conocen tales apósitos para heridas.

Trasplante de PDC utilizando armazones

55 Las células de la invención o los cocultivos de las mismas pueden sembrarse sobre un andamiaje o armazón tridimensional e implantarse *in vivo*, donde las células sembradas proliferarán sobre la superficie del andamiaje y formarán un tejido de reemplazo *in vivo* en cooperación con las células del sujeto. Puede implantarse un andamiaje de este tipo en combinación con uno cualquiera o más de entre factores de crecimiento, células, fármacos u otros componentes descritos anteriormente que estimulen la formación de tejido o potencien o mejoren de otra manera la práctica de la invención.

60 Las células de la invención pueden utilizarse para producir nuevo tejido *in vitro*, que a continuación puede implantarse, trasplantarse o insertarse de otra manera en un sitio que necesita la reparación, la sustitución o el aumento de tejido en un sujeto.

65

En una forma de realización no limitativa, las células de la invención se utilizan para producir un constructo tisular tridimensional *in vitro*, que a continuación se implanta *in vivo*. Como un ejemplo de la producción de constructos tisulares tridimensionales, véase la patente de Estados Unidos N° 4.963.489. Por ejemplo, las células de la invención pueden inocularse o "sembrarse" sobre un andamiaje o armazón tridimensional, y hacerse proliferar o crecer *in vitro* para formar un tejido vivo que puede implantarse *in vivo*.

Las células de la invención pueden hacerse crecer libremente en un recipiente de cultivo hasta la subconfluencia o la confluencia, recogerse del cultivo e inocularse sobre un andamiaje tridimensional. La inoculación del andamiaje tridimensional con una alta concentración de células, por ejemplo, de aproximadamente 10^5 a 10^8 células por mililitro, dará como resultado la constitución del soporte tridimensional en períodos de tiempo relativamente más cortos.

Los ejemplos de armazones que pueden utilizarse en la presente invención incluyen mallas no tejidas, espumas porosas o péptidos de autoensamblaje. Las mallas no tejidas pueden formarse, por ejemplo, utilizando fibras compuestas por un copolímero absorbible sintético de ácidos glicólico y láctico (PGA/PLA), que se vende con el nombre comercial VICRYL (Ethicon, Inc., Somerville, NJ). También son posibles armazones las espumas, compuestas, por ejemplo, por copolímero poli(epsilon-caprolactona)/poli(ácido glicólico) (PCL/PGA), formadas mediante procesos tales como la criodesecación, o liofilizadas, como se analiza en la patente de EE.UU. N° 6.355.699. También pueden utilizarse hidrogeles tales como péptidos de autoensamblaje (por ejemplo, RAD16). Estos materiales se utilizan frecuentemente como soportes para el crecimiento de tejido.

El andamiaje tridimensional también puede estar hecho de materiales cerámicos, incluidos pero no limitados a: mono, di, tri, alfa-tri, beta-tri y tetra-fosfato cálcico, hidroxiapatita, fluoroapatitas, sulfatos cálcicos, fluoruros cálcicos, óxidos de calcio, carbonatos cálcicos, fosfatos de calcio y magnesio, vidrios biológicamente activos tales como BIOGLASS (Universidad de Florida, Gainesville, FL), y mezclas de los mismos. Existen varios materiales cerámicos biocompatibles porosos adecuados actualmente disponibles en el mercado comercial tales como SURGIBON (Unilab Surgibone, Inc., Canadá), ENDOBON (Merck Biomaterial France, Francia), CEROS (Mathys, A.G., Bettlach, Suiza) e INTERPORE (Interpore, Irvine, CA, Estados Unidos), y productos de injerto óseo de colágeno mineralizado tales como HEALOS (Orquest, Inc., Mountain View, CA) y VITOSS, RHAKOSS y CORTOSS (Orthovita, Malvern, PA). El andamiaje puede ser una mixtura, mezcla o composite de materiales naturales y/o sintéticos.

Según una forma de realización preferente, el andamiaje es un fieltro, que puede estar compuesto por un hilo multifilamento hecho de un material bioabsorbible, por ejemplo, copolímeros o mezclas de PCL, PLA, PGA, o ácido hialurónico. El hilo se convierte en un fieltro mediante técnicas convencionales de procesamiento textil que consisten en prensado, corte, cardado y punzonado.

En otra forma de realización preferente, las células de la invención se siembran sobre armazones de espuma que pueden ser estructuras composite. Además, el andamiaje tridimensional puede moldearse en una forma útil, tal como la de la parte externa de la oreja, u otra estructura específica del cuerpo a reparar, reemplazar o aumentar.

En algunas formas de realización, el andamiaje se trata antes de inocular las células de la invención con el fin de potenciar la fijación celular. Por ejemplo, antes de la inoculación con las células de la invención, podrían tratarse matrices de nailon con ácido acético 0,1 molar e incubarse en polilisina, PBS y/o colágeno para recubrir el nailon. Podría tratarse poliestireno de manera similar utilizando ácido sulfúrico.

Las superficies externas del andamiaje tridimensional pueden modificarse para mejorar la fijación o el crecimiento de las células y la diferenciación del tejido, tal como mediante el recubrimiento por plasma del andamiaje o la adición de una o más proteínas (por ejemplo, colágenos, fibras elásticas, fibras reticulares), glicoproteínas, glicosaminoglicanos (por ejemplo, sulfato de heparina, condroitín-4-sulfato, condroitín-6-sulfato, sulfato de dermatano, sulfato de queratina), una matriz celular y/u otros materiales tales como, pero sin limitarse a, gelatina, alginatos, agar, agarosa y gomas vegetales, entre otros.

En algunas formas de realización, el armazón está compuesto por o está tratado con materiales que lo hacen no trombogénico. Estos tratamientos y materiales también estimulan y sustentan el crecimiento endotelial, la migración y la deposición de matriz extracelular. Los ejemplos de estos materiales y tratamientos incluyen, pero no se limitan a, materiales naturales tales como proteínas de la membrana basal tales como laminina y colágeno tipo IV, materiales sintéticos tales como ePTFE, y siliconas de poliuretano urea segmentadas, tales como PURSPAN (The Polymer Technology Group, Inc., Berkeley, CA). Estos materiales pueden tratarse adicionalmente para hacer el armazón no trombogénico. Tales tratamientos incluyen antitrombóticos tales como la heparina, y tratamientos que modifican la carga superficial del material tales como el recubrimiento por plasma.

En algunos aspectos de la invención, es importante recrear en cultivo el microambiente celular que se encuentra *in vivo*, de manera que pueda variar el grado de crecimiento de las células de la invención antes de su

implantación *in vivo* o uso *in vitro*. Además, pueden añadirse al medio de cultivo factores de crecimiento antes de, durante o después de la inoculación de las células para activar la diferenciación y la formación de tejido por las PDC.

5 Puede modificarse el andamiaje tridimensional de manera que se potencie el crecimiento de las células y la producción de tejido sobre el mismo, o de manera que se reduzca el riesgo de rechazo del implante. Por lo tanto, pueden añadirse al andamiaje uno o más compuestos biológicamente activos, incluidos pero no limitados a, antiinflamatorios, inmunosupresores o factores de crecimiento.

10 **Usos terapéuticos de la matriz extracelular y lisados celulares derivados de las PDC**

Como alternativa a la implantación de las células de la invención, o al tejido vivo producido a partir de las mismas, la divulgación describe un componente o producto de las PDC, tal como la matriz extracelular (ECM) o el lisado celular producidos por esas células para su uso en la reparación, la sustitución o el aumento de tejido.

15 En algunas formas de realización de la divulgación, después de haberse cultivado *in vitro* las células de la invención, tal como, por ejemplo, utilizando un sistema de armazón tridimensional que se describe en el presente documento, de manera que se haya secretado sobre el andamiaje una cantidad deseada de ECM. Una vez secretada la ECM sobre el andamiaje, pueden sacarse las células. La ECM puede procesarse para su uso posterior, por ejemplo, como preparación inyectable.

20 En algunas formas de realización de la divulgación, se destruyen las células y se extraen del andamiaje los restos celulares (por ejemplo, membranas celulares). Este proceso puede llevarse a cabo de varias maneras diferentes. Por ejemplo, el tejido vivo puede congelarse instantáneamente en nitrógeno líquido sin un crioprotector, o el tejido puede sumergirse en agua destilada estéril de manera que las células estallen en respuesta a la presión osmótica. Una vez destruidas las células, pueden romperse las membranas celulares y extraerse los restos celulares tratándolos con un aclarado con detergente suave, como EDTA, CHAPS o un detergente zwitteriónico. Una ventaja de utilizar un aclarado con detergente suave es que solubiliza las proteínas unidas a la membrana, que suelen ser muy antigénicas.

30 Como alternativa, el tejido puede digerirse enzimáticamente y/o extraerse con reactivos que rompen las membranas celulares. Los ejemplos de tales enzimas incluyen, pero no se limitan a, hialuronidasa, dispasas, proteasas y nucleasas (por ejemplo, desoxirribonucleasa y ribonucleasa). Los ejemplos de detergentes incluyen detergentes no iónicos tales como, por ejemplo, alcohol alquilariilpoliéter (TRITON®X-100), octilfenoxi polietoxietanol (Rohm and Haas Philadelphia, PA), BRIJ-35, un lauril éter de polietoxietanol (Atlas Chemical Co., San Diego, CA), polisorbato 20 (Tween 20®), un monolaureato de polietoxietanol sorbitán (Rohm and Haas), lauril éter de polietileno (Rohm and Haas); y detergentes iónicos tales como, por ejemplo, dodecil sulfato sódico, alcoholes alifáticos superiores sulfatados, alcanos sulfonados y alquilarenos sulfonados que contienen de 7 a 22 átomos de carbono en una cadena ramificada o no ramificada.

40 El armazón que comprende la ECM puede utilizarse terapéuticamente como se ha descrito anteriormente. Como alternativa, la ECM puede recogerse del armazón. La recogida de la ECM puede lograrse de diversas maneras, dependiendo, por ejemplo, de si el armazón es biodegradable o no biodegradable. Por ejemplo, si el andamiaje no es biodegradable, la ECM puede extraerse sometiendo el andamiaje a sonicación, chorros de agua a alta presión, raspado mecánico o tratamiento suave con detergentes o enzimas, o cualquier combinación de lo anterior.

50 Si el andamiaje es biodegradable, la ECM puede recogerse, por ejemplo, permitiendo que el andamiaje se degrade o disuelva en solución. Como alternativa, si el andamiaje biodegradable está compuesto por un material que puede inyectarse junto con la ECM, el andamiaje y la ECM pueden procesarse *in toto* para su posterior inyección. Como alternativa, la ECM puede extraerse del andamiaje biodegradable mediante cualquiera de los métodos descritos anteriormente para la recogida de ECM desde un andamiaje no biodegradable. Todos los procesos de recogida se diseñan preferentemente para no desnaturalizar la ECM producida por las células de la invención.

55 Una vez recogida la ECM, puede procesarse adicionalmente. La ECM puede homogeneizarse hasta partículas finas mediante técnicas conocidas en la técnica tales como, por ejemplo, mediante sonicación, de manera que puedan pasar a través de una aguja quirúrgica. Los componentes de la ECM pueden reticularse, si se desea, mediante irradiación gamma. Preferentemente, la ECM puede irradiarse entre 0,25 mega rads y 2 mega rads para esterilizar y reticular la ECM. Resulta posible la química de reticulación utilizando agentes que sean tóxicos, tal como el glutaraldehído, pero generalmente no resulta preferente.

60 Los lisados celulares preparados a partir de las poblaciones de las células derivadas posparto también tienen muchas utilidades. En una forma de realización de la divulgación, se preparan lisados de células enteras, por ejemplo, rompiendo las células sin posterior separación de las fracciones celulares. En otra forma de realización de la divulgación, se separa una fracción de membrana celular de una fracción soluble de las células mediante métodos de rutina conocidos en la técnica, por ejemplo, centrifugación, filtración, o métodos similares. El uso de fracciones celulares solubles *in vivo* permite utilizar en un paciente el medio intracelular beneficioso sin provocar rechazo o una

65

5 respuesta adversa. En la técnica se conocen métodos para lisar células e incluyen diversos medios de rotura mecánica, rotura enzimática o rotura química, o combinaciones de los mismos. Tales lisados celulares pueden prepararse a partir de células directamente en su medio de crecimiento y, por lo tanto, que contiene factores de crecimiento secretados y similares, o pueden prepararse a partir de células limpias de medio, por ejemplo, PBS u otra solución. Las células lavadas pueden resuspenderse a concentraciones superiores a la densidad de población original, si resulta preferente. Los lisados celulares preparados a partir de poblaciones de células derivadas posparto pueden utilizarse tal como están, concentrarse adicionalmente mediante, por ejemplo, ultrafiltración o liofilización, o incluso secarse, purificarse parcialmente, combinarse con transportadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables como se conocen en la técnica, o combinarse con otros compuestos tales como sustancias biológicas, por ejemplo composiciones de proteínas farmacéuticamente útiles. Los lisados celulares pueden utilizarse *in vitro* o *in vivo*, solos o por ejemplo, con células. Los lisados celulares, si se introducen *in vivo*, pueden introducirse localmente en un sitio de tratamiento, o a distancia para proporcionar a un paciente, por ejemplo, los factores de crecimiento celular necesarios.

15 Las cantidades y/o relaciones de proteínas pueden ajustarse mezclando la ECM o el lisado celular producidos por las células de la invención con una ECM o un lisado celular de uno o más de otros tipos de células. Además, pueden incorporarse en la preparación de ECM o lisado celular sustancias biológicamente activas tales como proteínas, factores de crecimiento y/o medicamentos. Las sustancias biológicamente activas ejemplares incluyen antiinflamatorios y factores de crecimiento que promueven la curación y la reparación del tejido. Las células pueden coadministrarse con las ECM o los lisados celulares. Puede formularse una ECM o un lisado celular de las PDC para la administración como se ha descrito anteriormente para las PDC.

Uso de las PDC para la detección *in vitro* de la eficacia o toxicidad de fármacos

25 Las células y los tejidos de la invención y la divulgación pueden utilizarse *in vitro* para cribar una gran diversidad de compuestos para determinar la eficacia y citotoxicidad de agentes farmacéuticos, factores de crecimiento/reguladores, antiinflamatorios. Con este fin, las células de la invención, o los cultivos tisulares descritos anteriormente, se mantienen *in vitro* y se exponen al compuesto a ensayar. La actividad de un compuesto citotóxico puede medirse por su capacidad para dañar o destruir las células en cultivo. Esto puede evaluarse fácilmente mediante técnicas de tinción vital. El efecto de los factores de crecimiento/regulación puede evaluarse analizando el número de células vivas *in vitro*, por ejemplo, mediante recuentos totales de células y recuentos diferenciales de células. Esto puede lograrse utilizando técnicas citológicas y/o histológicas convencionales, incluido el uso de técnicas inmunocitoquímicas mediante anticuerpos que definen los antígenos celulares específicos del tipo. Puede evaluarse el efecto de diversos fármacos sobre las células de la invención ya sea en cultivo en suspensión o en el sistema tridimensional descrito anteriormente.

40 Las células y los tejidos de la invención y la divulgación pueden utilizarse como sistemas modelo para el estudio de estados fisiológicos o patológicos. Las células y los tejidos de la invención y la divulgación también pueden utilizarse para estudiar el mecanismo de acción de las citocinas, los factores de crecimiento y los mediadores inflamatorios, por ejemplo, IL-1, TNF y las prostaglandinas. Además, pueden cribarse agentes farmacéuticos y/o citotóxicos para detectar los más eficaces para un paciente en particular. A continuación, los agentes que demuestren ser eficaces *in vitro* podrían utilizarse para tratar al paciente terapéuticamente.

Uso de las PDC para producir moléculas biológicas

45 En una forma de realización adicional, las células de la invención pueden cultivarse *in vitro* para producir productos biológicos con alto rendimiento. Por ejemplo, tales células, que producen de forma natural un producto biológico particular de interés (por ejemplo, un factor de crecimiento, un factor regulador o una hormona peptídica), o que han sido modificadas por ingeniería genética para que produzcan un producto biológico, podrían someterse a expansión clonal utilizando, por ejemplo, el sistema de cultivo tridimensional descrito anteriormente. Si las células excretan el producto biológico en el medio nutriente, el producto puede aislarse fácilmente a partir del medio acondicionado o gastado mediante técnicas de separación convencionales, por ejemplo, tales como la precipitación diferencial de proteínas, la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de filtración en gel, la electroforesis y la cromatografía de líquidos de alto rendimiento. Puede utilizarse un "biorreactor" para aprovechar el método de flujo para alimentar, por ejemplo, un cultivo tridimensional *in vitro*.

60 Básicamente, a medida que se hacen pasar los medios recién preparados por el cultivo tridimensional, el producto biológico se elimina por lavado del cultivo y, a continuación, puede aislarse del efluente, como se ha indicado anteriormente.

Como alternativa, un producto biológico de interés puede permanecer dentro de la célula y, por tanto, su recogida puede hacer necesario lisar las células. A continuación, el producto biológico puede purificarse utilizando una cualquiera o más de las técnicas anteriormente mencionadas.

65 **Kits**

Las PDC y los componentes y productos de las mismas pueden emplearse de manera práctica como parte de un kit, por ejemplo, para el cultivo o la implantación. Por consiguiente, se contempla un kit que incluye las PDC y componentes adicionales, tales como una matriz (por ejemplo, un armazón), 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 (ya sea en forma líquida o en polvo), compuestos antibióticos, hormonas, y similares. Aunque el kit puede incluir cualquiera de tales componentes, incluye preferentemente todos los ingredientes necesarios para su uso previsto. Específicamente, la invención proporciona un kit que comprende la población de células de la invención y un componente adicional seleccionado de entre un armazón, un agente hidratante, un sustrato de cultivo celular y medios de cultivo celular. Si se desea, el kit también puede incluir células (por lo general crioconservadas), que pueden sembrarse en la estructura reticular como se describe en el presente documento.

En otro aspecto, la invención proporciona kits de la invención que utilizan las PDC, poblaciones de PDC, componentes y productos de las PDC en diversos métodos para el aumento, la regeneración y la reparación como se ha descrito anteriormente. En algunas formas de realización, los kits pueden incluir una o más poblaciones de células, incluidas al menos las PDC y un transportador farmacéuticamente aceptable (líquido, semisólido o sólido). Los kits también pueden incluir opcionalmente un medio de administración de las células, por ejemplo mediante inyección. Los kits pueden incluir adicionalmente instrucciones para el uso de las células. Los kits preparados para su uso en hospitales de campaña, tal como para uso militar, pueden incluir suministros para todo el procedimiento, incluidos los armazones tisulares, las suturas quirúrgicas, y similares, en los que las células se utilizarán junto 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 entre (1) las PDC o componentes o productos de las PDC, (2) reactivos para poner en práctica el método *in vitro*, (3) otras células o poblaciones de células, cuando proceda, y (4) instrucciones para llevar a cabo el método *in vitro*.

25

Crioconservación y creación de un banco de PDC

Las PDC de la invención pueden crioconservarse y mantenerse o almacenarse en un "banco de células". La crioconservación de las células de la invención puede llevarse a cabo según métodos conocidos. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, las células pueden suspenderse en un "medio congelante", tal como, por ejemplo, un medio de cultivo que comprende adicionalmente del 0 al 95 por ciento de FBS y del 0 al 10 por ciento de dimetilsulfóxido (DMSO), con o sin un 5 a 10 por ciento de glicerol, a una densidad, por ejemplo, de aproximadamente $0,5 \text{ a } 10 \times 10^6$ células por mililitro. El medio de crioconservación puede comprender agentes de crioconservación, incluidos pero no limitados a metilcelulosa. Las células se dispensan en ampollas de vidrio o plástico, que a continuación se sellan y se transfieren a la cámara de congelación de un congelador de velocidad controlada. La velocidad óptima de congelación puede determinarse empíricamente. Un congelador de velocidad programable por ejemplo, puede dar un cambio de temperatura de -1°C a -10°C por minuto. La temperatura de crioconservación preferente es de aproximadamente -80°C a aproximadamente -180°C , más preferentemente es de aproximadamente -90°C a aproximadamente -160°C , y lo más preferentemente es de aproximadamente -125°C a aproximadamente -140°C . Las células crioconservadas se transfieren preferentemente a nitrógeno líquido antes de descongelarse para su uso. En algunas formas de realización, por ejemplo, una vez que las ampollas han alcanzado aproximadamente -90°C , se transfieren a un área de almacenamiento con nitrógeno líquido. Las células crioconservadas pueden almacenarse durante años.

Las células crioconservadas de la invención constituyen un banco de células, porciones de las cuales pueden "retirarse" mediante descongelación y, a continuación, utilizarse según sea necesario. La descongelación generalmente debe llevarse a cabo rápidamente, por ejemplo, transfiriendo una ampolla del nitrógeno líquido a un baño de agua a 37°C . Los contenidos descongelados de la ampolla deben transferirse inmediatamente en condiciones estériles a un recipiente de cultivo que contenga un medio apropiado tal como DMEM acondicionado con FBS al 10 por ciento.

En todavía otro aspecto, la invención proporciona también la creación de bancos de tejidos, células y poblaciones de células de la invención. Como se ha analizado anteriormente, las células se crioconservan fácilmente. Se describen métodos de crioconservación de las células en un banco, en el que las células se almacenan congeladas y se asocian con una caracterización completa de las células en base a las propiedades inmunitarias, bioquímicas y genéticas de las células. Las células así congeladas pueden utilizarse para una terapia autóloga, singénica o alogénica, dependiendo de los requisitos del procedimiento y de las necesidades del paciente. Preferentemente, la información sobre cada muestra crioconservada se almacena en un ordenador, que puede consultarse en base a las necesidades del cirujano, del procedimiento y del paciente, realizándose coincidencias adecuadas en base a la caracterización de las células o poblaciones. Preferentemente, las células de la invención se cultivan y expanden hasta la cantidad deseada de células y se preparan composiciones de células terapéuticas ya sea por separado o como cocultivos, en presencia o ausencia de una matriz o soporte. Aunque para algunas aplicaciones puede ser preferente utilizar células recién preparadas, el resto puede crioconservarse y guardarse en el banco congelando las células e introduciendo la información en el ordenador para asociar la entrada de ordenador con las muestras. Aun cuando no es necesario hacer coincidir una fuente o donante con un receptor de tales células, con fines inmunitarios, el sistema del banco hace que sea fácil hacer coincidir, por ejemplo, las propiedades

65

bioquímicas o genéticas deseables de las células del banco con las necesidades terapéuticas. Tras hacer coincidir las propiedades deseadas con una muestra del banco, la muestra se recupera, y se prepara para su uso terapéutico. También pueden conservarse (por ejemplo, crioconservarse, liofilizarse) componentes o lisados celulares preparados como se describe en el presente documento y crearse bancos de los mismos según la presente divulgación.

Los siguientes ejemplos describen varios aspectos de formas de realización de la invención con mayor detalle. Estos ejemplos se proporcionan para ilustrar adicionalmente, no para limitar, aspectos de la invención que se describen en el presente documento.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Derivación de células a partir de tejido placentario posparto

Se obtuvieron placentas posparto tras el nacimiento de una gestación a término o prematura. Las células se recolectaron de cinco donantes distintos de tejido placentario. Se ensayaron diferentes métodos de aislamiento de células en cuanto a su capacidad para proporcionar células con: 1) el potencial de diferenciarse a células con diferentes fenotipos, o 2) el potencial de proporcionar factores tróficos críticos útiles para otras células y tejidos.

Métodos y materiales

Aislamiento de células de la placenta. Se obtuvo tejido placentario del National Disease Research Interchange (NDRI, Filadelfia, PA). Los tejidos se obtuvieron de una gestación en el momento de un parto quirúrgico normal. Las células placentarias se aislaron asépticamente en una campana de flujo laminar. Para eliminar la sangre y los residuos, se lavó el tejido en solución salina tamponada con fosfato (PBS; Invitrogen, Carlsbad, CA) en presencia de 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomina y 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina (Invitrogen Carlsbad, CA). A continuación, se disociaron mecánicamente los tejidos en placas de cultivo tisular de 150 cm² en presencia de 50 mililitros de medio (DMEM con bajo contenido de glucosa o DMEM con alto contenido de glucosa; Invitrogen), picando el tejido finamente hasta obtener una pulpa fina. Los tejidos picados se transfirieron a tubos cónicos de 50 mililitros (aproximadamente 5 gramos de tejido por tubo).

A continuación, se digirió el tejido en medio DMEM con bajo contenido de glucosa o en medio DMEM con alto contenido de glucosa, que contenía cada uno 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomina y 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina y enzimas de digestión. En algunos experimentos, se utilizó una mezcla enzimática de colagenasa y dispasa ("C:D"; colagenasa (Sigma, St. Louis, MO), 500 unidades/mililitro, y dispasa (Invitrogen), 50 unidades/mililitro en medio DMEM con bajo contenido de glucosa). En otros experimentos se utilizó una mezcla de colagenasa, dispasa y hialuronidasa ("C:D:H") (colagenasa, 500 unidades/mililitro; dispasa, 50 unidades/mililitro, y hialuronidasa (Sigma), 5 unidades/mililitro, en DMEM con bajo contenido de glucosa). Los tubos cónicos que contenían el tejido, el medio y las enzimas de digestión se incubaron a 37°C en un agitador orbital (Environ, Brooklyn, NY) a 225 rpm durante 2 horas.

Después de la digestión, los tejidos se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos, y se aspiró el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 20 mililitros de Medio de crecimiento (DMEM con bajo contenido de glucosa (Invitrogen), suero bovino fetal al 15 por ciento (v/v) (FBS; suero bovino definido; lote n° AND18475; Hyclone, Logan, UT), 2-mercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma), 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomina, 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina B (Invitrogen, Carlsbad, CA)). La suspensión celular se filtró a través de un filtro celular de nailon de 70 micrómetros (BD Biosciences). Se hizo pasar por el filtro un aclarado de 5 mililitros más que comprendía Medio de crecimiento. A continuación, se hizo pasar la suspensión celular por un filtro celular de nailon de 40 micrómetros (BD Biosciences), seguido de un aclarado de 5 mililitros más de Medio de crecimiento.

El filtrado se resuspendió en Medio de crecimiento (un volumen total de 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 recién preparado. Este proceso (es decir, la resuspensión, centrifugación y aspiración) se repitió dos veces más.

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

Las células aisladas de la placenta se sembraron a razón de 5.000 células/cm² en matraces en T de 75 cm² recubiertos con gelatina (Corning Inc., Corning, NY) en Medio de crecimiento (DMEM con bajo contenido de glucosa (Invitrogen), suero bovino definido al 15 por ciento (v/v) (Hyclone, Logan, UT; lote n° AND18475), 2-mercaptoetanol

al 0,001 por ciento (v/v) (Sigma), 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomina, 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina (Invitrogen)). Al cabo de aproximadamente 2-4 días, se aspiró de los matraces el medio gastado. Las células se lavaron tres veces con PBS para eliminar los residuos y las células de origen sanguíneo. A continuación, se reabasteció a las células con Medio de crecimiento y se dejaron crecer hasta la confluencia (aproximadamente 10 días del pase 0 al pase 1). En pases posteriores (del pase 1 al 2, etc.), las células alcanzaron la subconfluencia (75-85 por ciento de confluencia) en 4-5 días. Para estos pases posteriores, las células se sembraron a razón de 5.000 células/cm². Las células se cultivaron en una incubadora humidificada con dióxido de carbono al 5 por ciento y oxígeno al 20 por ciento, a 37°C.

Aislamiento de poblaciones de células de la placenta de origen materno y de origen neonatal. El protocolo de aislamiento celular se realizó asépticamente en una campana de flujo laminar. El tejido placentario se lavó en solución salina tamponada con fosfato (PBS; Invitrogen, Carlsbad, CA) en presencia de antimicótico y antibiótico (100 U/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomina, 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina B; Invitrogen) para eliminar la sangre y los residuos. A continuación, se seccionó el tejido placentario en tres secciones: la línea superior (lado o aspecto neonatal), la línea media (aislamiento de células mixtas, neonatales y maternas, o zona de las vellosidades) y la línea inferior (lado o aspecto materno).

Las secciones separadas se lavaron individualmente varias veces en PBS con antibiótico/antimicótico para eliminar adicionalmente la sangre y los residuos. A continuación, cada sección se disoció mecánicamente en placas de cultivo tisular de 150 cm² en presencia de 50 mililitros de DMEM con bajo contenido de glucosa (Invitrogen) hasta obtener una pulpa fina. La pulpa se transfirió a tubos cónicos de 50 mililitros. Cada tubo contenía aproximadamente 5 gramos de tejido. El tejido se digirió en medio DMEM con bajo contenido de glucosa o en medio DMEM con alto contenido de glucosa que contenía 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomina y 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina y enzimas de digestión. En algunos experimentos se utilizó una mezcla enzimática de colagenasa y dispasa ("C:D") que contenía colagenasa (Sigma, St. Louis, MO) a 500 unidades/mililitro y dispasa (Invitrogen) a 50 unidades/mililitro en medio DMEM con bajo contenido de glucosa. En otros experimentos se utilizó una mezcla de colagenasa, dispasa y hialuronidasa ("C:D:H") (colagenasa, 500 unidades/mililitro; dispasa, 50 unidades/mililitro, y hialuronidasa (Sigma), 5 unidades/mililitro en DMEM con bajo contenido de glucosa). Los tubos cónicos que contenían el tejido, el medio y las enzimas de digestión se incubaron durante 2 horas a 37°C en un agitador orbital (Environ, Brooklyn, NY) a 225 rpm.

Después de la digestión, los tejidos se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos, el sobrenadante resultante se eliminó por aspiración. El sedimento se resuspendió en 20 mililitros de Medio de crecimiento (DMEM con bajo contenido de glucosa (Invitrogen), suero bovino fetal al 15% (v/v) (FBS; suero bovino definido; lote n° AND18475; Hyclone, Logan, UT), 2-mercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma, St. Louis, MO), 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomina, 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina B; Invitrogen)). La suspensión celular se filtró a través de un filtro celular de nailon de 70 micrómetros (BD Biosciences), seguido de un aclarado con 5 mililitros más de Medio de crecimiento. La suspensión celular total se hizo pasar a través de un filtro celular de nailon de 40 micrómetros (BD Biosciences), seguido de 5 mililitros más de Medio de crecimiento como aclarado.

El filtrado se resuspendió en Medio de crecimiento (un volumen total de 50 mililitros) y se centrifugó a 150 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se aspiró y el sedimento celular se resuspendió en 50 mililitros de Medio de crecimiento recién preparado. Este proceso (es decir, la resuspensión, centrifugación y aspiración) se repitió dos veces más.

Después de la centrifugación final, el sobrenadante se aspiró y el sedimento celular se resuspendió en 5 mililitros de Medio de crecimiento recién preparado. Se determinó un recuento de células mediante el ensayo de exclusión con azul de tripano. A continuación, las células se cultivaron en condiciones normales.

Aislamiento de PDC utilizando diferentes condiciones de crecimiento. Las células derivadas de la placenta se digirieron en medio de crecimiento con o sin 2-mercaptoetanol al 0,001 por ciento (v/v) (Sigma, St. Louis, MO), utilizando la combinación enzimática de C:D:H, según los procedimientos proporcionados anteriormente. Las células derivadas de la placenta así aisladas se sembraron en las condiciones que se presentan en la Tabla 1-1 y se cultivaron en presencia de penicilina/estreptomina. Se realizaron pases de las células hasta cuatro veces después de la siembra y se crioconservaron. Las células crioconservadas se guardaron en un banco.

Tabla 1-1. Aislamiento y expansión en cultivo de células placentarias en distintas condiciones:

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

Leyenda: Lg: bajo contenido de glucosa; N: nada; Y: sí; BME: beta-mercaptoetanol; FGF: factor de crecimiento de fibroblastos; EGF: factor de crecimiento epidérmico; PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas; VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular.

Resultados

Aislamiento de PDC utilizando diferentes condiciones de crecimiento. En todas las condiciones presentadas en la Tabla 1-1, las células se fijaron y expandieron bien entre el pase 0 y 1. Las células en la condición 5 a 8 y 13 a 16 demostraron proliferar bien hasta al menos cuatro pases después de la siembra.

Aislamiento de células a partir de placenta utilizando diferentes combinaciones enzimáticas. La digestión del tejido con colagenasa:dispasa y colagenasa:dispasa:hialuronidasa dio como resultado el aislamiento de poblaciones de células a partir de tejidos placentarios que se expandieron fácilmente.

Resumen. Las PDC pueden aislarse mediante una combinación de una metaloproteasa de matriz y una proteasa neutra, tal como pero no limitada a, una combinación de colagenasa y dispasa. Las PDC se aíslan preferentemente utilizando una combinación enzimática de una metaloproteasa de matriz, una proteasa neutra y una enzima mucolítica que degrada el ácido hialurónico, tal como, pero no limitada a, una combinación de colagenasa, dispasa y hialuronidasa o una combinación de LIBERASE (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN) y hialuronidasa. También puede utilizarse Blendzyme 3 que es colagenasa (4 unidades Wunsch/g) y termolisina (1714 unidades de caseína/g) junto con hialuronidasa para aislar las células.

EJEMPLO 2

Evaluación de medios de crecimiento para las células derivadas de la placenta

Se evaluaron varios medios de cultivo celular en cuanto a su capacidad para sustentar el crecimiento de las células derivadas de la placenta. Se evaluó el crecimiento de las células derivadas de la placenta en oxígeno a concentración normal (20%) y a baja concentración (5%) al cabo de 3 días mediante el ensayo colorimétrico MTS.

Métodos y materiales

Se sembraron células derivadas de la placenta en pase 8 (P8) a 1×10^3 células/pocillo en placas de 96 pocillos en Medio de crecimiento (DMEM con bajo contenido de glucosa (Gibco, Carlsbad CA), suero bovino fetal al 15% (v/v) (nº de cat. SH30070.03; Hyclone, Logan, UT), betamercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma, St. Louis, MO), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin (Gibco)). Después de 8 horas, el medio se cambió como se describe en la Tabla 2-1, y las células se incubaron en oxígeno a concentración normal (20%, v/v) o a baja concentración (5%, v/v) a 37°C, CO₂ al 5% durante 48 horas. Se añadió MTS al medio de cultivo (CELLTITER96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Madison, WI) durante 3 horas y se midió la absorbancia a 490 nanómetros (Molecular Devices, Sunnyvale CA).

Tabla 2-1. Medios de cultivo evaluados

Medio de cultivo	Proveedor	% de suero bovino fetal añadido (v/v)
DMEM con bajo contenido de glucosa	Gibco Carlsbad CA	0, 2 ó 10
DMEM con alto contenido de glucosa	Gibco Carlsbad CA	0, 2 ó 10
RPMI 1640	Mediatech, Inc. Herndon, VA	0, 2 ó 10
Cell gro-free (sin suero, sin proteínas)	Mediatech, Inc. Herndon, VA	---
F10 de Ham	Mediatech, Inc. Herndon, VA	0, 2 ó 10
MSCGM (completo con suero)	Cambrex, Walkersville, MD	0, 2 ó 10
Completo-sin suero, con albúmina	Mediatech, Inc. Herndon, VA	---
Medio de crecimiento	NA	---
F12 de Ham	Mediatech, Inc. Herndon, VA	0, 2 ó 10
de Iscove	Mediatech, Inc. Herndon, VA	0, 2 ó 10
Medio basal de Eagle	Mediatech, Inc. Herndon, VA	0, 2 ó 10
DMEM/F12 (1:1)	Mediatech, Inc. Herndon, VA	0, 2 ó 10
MSCGM: medio Mesenchymal Stem Cell Growth Medium		

Resultados

Las curvas patrón para el ensayo de MTS establecieron una correlación lineal entre un aumento de la absorbancia y un aumento del número de células. Los valores de absorbancia obtenidos se convirtieron en números estimados de células y se calculó el cambio (%) con respecto a la siembra inicial.

La adición de suero a los medios en condiciones normales de oxígeno dio como resultado un aumento de la absorbancia dependiente de la dosis reproducible y, por lo tanto, del número de células viables (extrapolado). La adición de suero a MSCGM completo dio como resultado una disminución de la absorbancia dependiente de la dosis. En los medios sin suero añadido, las células crecieron solamente en Cellgro, F10 de Ham y DMEM.

La reducción de oxígeno aumentaba la velocidad de crecimiento de las células en Medio de crecimiento, F10 de Ham y MSCGM.

En orden decreciente de crecimiento, los medios que dieron como resultado el mejor crecimiento de las PDC fueron: Medio de crecimiento > MSCGM > de Iscove + FBS al 10% = DMEM con alto contenido de glucosa + FBS al 10% = F12 de Ham + FBS al 10% = RPMI 1640 + FBS al 10 %.

Resumen. Las células derivadas de la placenta pueden cultivarse en diversos medios de cultivo con concentración de oxígeno normal o baja. Las PDC crecieron en condiciones sin suero, por ejemplo, en F10 de Ham, Cellgro-free y DMEM. Las PDC también crecieron en condiciones sin proteínas, por ejemplo, en F10 de Ham y Cellgro-free. La reducción de oxígeno aumentaba la velocidad de crecimiento de las células en Medio de crecimiento, F10 de Ham, y MSCGM.

Referencia

Publicación de solicitud de EE.UU. nº 20040005704

EJEMPLO 3

Crecimiento de células posparto en medio que contiene D-valina

Se ha descrito que puede utilizarse un medio que contiene D-valina en lugar de la isoforma L-valina normal para inhibir selectivamente el crecimiento de células similares a fibroblastos en cultivo (Hongpaisan (2000) Cell Biol Int. 24:1-7; Sordillo *et al.*, (1988) Cell Biol Int Rep. 12:355-64). Se realizaron experimentos para determinar si las células derivadas de la placenta podían crecer en un medio que contenía D-valina.

Métodos y materiales

Se sembraron células derivadas de la placenta (P3) y fibroblastos (P9) a razón de 5×10^3 células/cm² en matraces T75 recubiertos con gelatina (Corning, Corning, NY). Después de 24 horas, se eliminó el medio y las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) para eliminar el medio residual. El medio se reemplazó con un Medio de crecimiento modificado (DMEM con D-valina (pedido extraordinario, Gibco), suero bovino fetal dializado al 15% (v/v) (Hyclone, Logan, UT), betamercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin (Gibco)).

Resultados

Las células derivadas de la placenta y los fibroblastos sembrados en el medio que contenía D-valina no proliferaron, a diferencia de las células sembradas en medio de crecimiento que contenía suero dializado. Los fibroblastos cambiaron morfológicamente, aumentando de tamaño y cambiando de forma. Todas las células murieron y, finalmente, se desprendieron de la superficie del matraz al cabo de 4 semanas.

5 **Resumen.** Las PDC necesitan L-valina para el crecimiento celular y para mantener la viabilidad a largo plazo.

EJEMPLO 4

10 Medios de crioconservación para las células derivadas de la placenta

El objetivo de este estudio fue determinar un medio de crioconservación adecuado para la crioconservación de las células derivadas de la placenta.

15 Métodos y materiales

Las células derivadas de la placenta cultivadas en Medio de crecimiento (DMEM con bajo contenido de glucosa (Gibco, Carlsbad CA), suero bovino fetal al 15% (v/v) (nº de cat. SH30070.03, Hyclone, Logan, UT), betamercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma, St. Louis, MO), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomina (Gibco)), en un matraz T75 recubierto con gelatina, se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS; Gibco) y se tripsinizaron utilizando 1 mililitro de tripsina/EDTA (Gibco). La tripsinización se detuvo añadiendo 10 mililitros de Medio de crecimiento. Las células se centrifugaron a 150 x g, se eliminó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en 1 mililitro de Medio de crecimiento. Se sacó una alícuota de la suspensión celular, 60 microlitros, y se añadió a 60 microlitros de azul de tripano (Sigma). Se estimó el número de células viables mediante un hemocitómetro. La suspensión celular se dividió en cuatro alícuotas iguales que contenían 88×10^4 células cada una. La suspensión celular se centrifugó y se resuspendió en 1 mililitro de cada uno de los medios que se presentan a continuación, y se transfirió a crioviales (Nalgene).

- 1.) Medio de crecimiento + DMSO al 10% (v/v) (Hybrimax, Sigma, St. Louis, MO)
- 2.) Medio de congelación celular con DMSO, con metilcelulosa, sin suero (C6295, Sigma, St. Louis, MO)
- 3.) Medio de congelación celular sin suero (C2639, Sigma, St. Louis, MO)
- 4.) Medio de congelación celular con glicerol (C6039, Sigma, St. Louis, MO)

Las células se enfriaron a aproximadamente 1°C/minuto durante la noche en un congelador a -80°C utilizando un recipiente de congelación "Mr Frosty" según las instrucciones del fabricante (Nalgene, Rochester, NY). Los viales de células se transfirieron a nitrógeno líquido durante 2 días antes de descongelarlos rápidamente en un baño de agua a 37°C. Las células se añadieron a 10 mililitros de Medio de crecimiento y se centrifugaron antes de estimar el número de células y su viabilidad como se ha indicado anteriormente. Las células se sembraron en matraces recubiertos con gelatina a razón de 5.000 células/cm² para determinar si las células se fijaban y proliferaban.

Resultados

Se evaluó, mediante tinción con azul de tripano, que la viabilidad inicial de las células a crioconservar era del 100%.

Hubo una reducción proporcional del número de células con viabilidad para C6295 debida a la lisis celular. Las células viables crioconservadas en las cuatro soluciones se fijaron, se dividieron y produjeron una monocapa confluyente en el plazo de 3 días. No hubo diferencia apreciable en la velocidad de crecimiento estimada.

50 **Resumen.** La crioconservación de células es un procedimiento disponible para la preparación de un banco de células o un producto celular. Se compararon cuatro mezclas de crioconservación en cuanto a su capacidad para proteger a las células derivadas de la placenta humana del daño por congelación. El medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y dimetilsulfóxido al 10% (v/v) (DMSO) es el medio preferente entre los comparados para la crioconservación de las células derivadas de la placenta.

EJEMPLO 5

60 Características de crecimiento de las células derivadas de la placenta

Se comparó el potencial de expansión celular de las células derivadas de la placenta con otras poblaciones de células madre aisladas. El proceso de expansión celular hasta la senescencia se conoce como límite de Hayflick (Hayflick (1974) J. Am. Geriatr. Soc. 22:1-12; Hayflick (1974) Gerontologist 14:37-45).

65 Materiales y métodos

Matraces recubiertos con gelatina. Se recubrieron matraces de plástico de cultivo tisular añadiendo 20 mililitros de gelatina porcina al 2% (p/v) (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 solución de gelatina, se añadieron 10 mililitros de solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA) y, a continuación, se aspiraron.

Comparación del potencial de expansión de las células derivadas de la placenta con otras poblaciones de células. Para comparar el potencial de expansión por crecimiento, se utilizaron las siguientes poblaciones de células: i) células madre mesenquimales (MSC; Cambrex, Walkersville, MD); ii) células derivadas de tejido adiposo (patente de Estados Unidos N° 6.555.374 B1; solicitud de patente de Estados Unidos US20040058412); iii) fibroblastos dérmicos normales (cc-2509 lote n° 9F0844; Cambrex, Walkersville, MD); iv) células derivadas de la placenta. Las células se sembraron inicialmente a razón de 5.000 células/cm² en matraces T75 recubiertos con gelatina en Medio de crecimiento (DMEM con bajo contenido de glucosa (Invitrogen, Carlsbad, CA), suero bovino definido al 15% (v/v) (Hyclone, Logan, UT; lote n° AND18475), 2-mercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma, St. Louis, MO), 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomina, 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina B; Invitrogen, Carlsbad, CA). Para pases posteriores, los cultivos celulares se trataron de la siguiente manera. Después de la tripsinización, se realizó el recuento de las células viables después de la tinción con azul de tripano (por ejemplo, la suspensión celular (50 microlitros) se combinó con azul de tripano (50 microlitros, Sigma, St. Louis MO); se estimó el número de células viables mediante un hemocitómetro).

Tras el recuento, las células se sembraron a razón de 5.000 células/cm² en matraces T75 recubiertos con gelatina en 25 mililitros de medio de crecimiento recién preparado. Las células se cultivaron en atmósfera normal con dióxido de carbono al 5% 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. Se repitió este proceso hasta que las células alcanzaron la senescencia.

En cada pase, las células se tripsinizaron y se realizó su recuento. Se calcularon el rendimiento de células viables, la duplicación de la población [$\ln(\text{células finales}/\text{células iniciales})/\ln 2$] y el tiempo de duplicación (tiempo en cultivo (h)/duplicación de la población). Con el fin de determinar la expansión celular óptima, se determinó el rendimiento celular total por pase multiplicando el rendimiento total para el pase anterior 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. Se ensayó el potencial de expansión de las células del banco en pase 10. Se ensayaron fibroblastos dérmicos normales (cc-2509 lote n° 9F0844; Cambrex, Walkersville, MD) y células derivadas de la placenta. Estas poblaciones de células habían sido guardadas en el banco en pase 10 previamente, habiéndose sembrado a razón de 5.000 células/cm² y dejado crecer hasta la confluencia 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 pase 10. Las células se descongelaron en condiciones normales y se realizó el recuento utilizando tinción con azul de tripano. A continuación, las células descongeladas se sembraron a razón de 1.000 células/cm² en Medio de crecimiento (DMEM con bajo contenido de glucosa (Invitrogen, Carlsbad, CA), suero bovino definido al 15% (v/v) (Hyclone, Logan, UT; lote n° AND18475), 2-mercaptoetanol al 0,001% (Sigma, St. Louis, MO), 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomina y 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina (Invitrogen, Carlsbad, CA)). Las células se cultivaron en condiciones atmosféricas normales a 37°C. El Medio de crecimiento se cambió dos veces por semana y las células se sometieron a pases a medida que alcanzaban aproximadamente el 85% de confluencia. Las células se sometieron a pases posteriormente hasta la senescencia. Las células se tripsinizaron y se realizó su recuento en cada pase. Se calcularon el rendimiento celular, la duplicación de la población ($\ln(\text{células finales}/\text{células iniciales})/\ln 2$) y el tiempo de duplicación (tiempo en cultivo (h)/duplicación de la población) para cada pase. El rendimiento celular total por pase se determinó multiplicando el rendimiento total para el pase anterior por el factor de expansión para cada pase (es decir, factor de expansión = células finales/células iniciales).

Expansión de células derivadas de la placenta a baja densidad a partir de una siembra inicial de células. En otro experimento se ensayó el potencial de expansión de cultivos de células derivadas de la placenta recién aisladas en condiciones de siembra a baja concentración celular. Las células derivadas de la placenta se aislaron como se describe en el Ejemplo 1. Las células se sembraron a razón de 1.000 células/cm² y se sometieron a pases como se ha descrito anteriormente hasta la senescencia. Las células se cultivaron en condiciones atmosféricas normales a 37°C. El Medio de crecimiento se cambió dos veces por semana. Las células se sometieron a pases a medida que alcanzaban aproximadamente el 85% de confluencia. En cada pase, las células se tripsinizaban y se realizaba su recuento mediante tinción con azul de tripano. Se calcularon el rendimiento celular, la duplicación de la población ($\ln(\text{células finales}/\text{células iniciales})/\ln 2$) y el tiempo de duplicación (tiempo en cultivo (h)/duplicación de la población) para cada pase. El rendimiento celular total por pase se determinó multiplicando el rendimiento total para el pase anterior por el factor de expansión para cada pase (es decir, factor de expansión = células finales/células iniciales). Las células se cultivaron en matraces recubiertos con gelatina y no recubiertos.

Expansión de células derivadas de la placenta neonatales o maternas clonales. Puede utilizarse la clonación con el fin de expandir con éxito una población de células neonatales o maternas a partir de tejido

placentario. Tras el aislamiento de tres poblaciones diferentes de células a partir de la placenta (aspecto neonatal, aspecto materno y zona de las vellosidades), estas poblaciones de células se expandieron en condiciones normales de crecimiento y, a continuación, se determinó el cariotipo para revelar la identidad de las poblaciones de células aisladas. Al aislar las células a partir de una madre que da a luz a un niño, es posible distinguir los cromosomas masculinos de los femeninos realizando extensiones de cromosomas en metafase. Estos experimentos pueden utilizarse para demostrar que las células de la línea superior tienen cariotipo positivo para el fenotipo neonatal, las células de la línea media tienen cariotipo positivo para los fenotipos neonatal y materno, y las células de la línea inferior tienen cariotipo positivo para las células maternas.

Otras condiciones de crecimiento. En otros experimentos, las células se expandieron en placas no recubiertas, recubiertas con colágeno, recubiertas con fibronectina, recubiertas con laminina, y recubiertas con proteína de membrana extracelular (por ejemplo, MATRIGEL (BD Discovery Labware, Bedford, MA)). Se ha demostrado que los cultivos se expanden bien en estas diferentes matrices.

Resultados

Comparación del potencial de expansión de las células derivadas de la placenta con otras poblaciones de células. Las células derivadas de la placenta se expandieron durante más de 40 pases, generando rendimientos celulares de $> 1 \times 10^{17}$ células en 60 días. Por el contrario, las MSC y los fibroblastos experimentaron senescencia después de < 25 días y < 60 días, respectivamente. Aunque tanto las células derivadas de tejido adiposo como las del epiplón se expandieron durante casi 60 días, generaron rendimientos celulares totales de $4,5 \times 10^{12}$ y $4,24 \times 10^{13}$ respectivamente. Por lo tanto, cuando se sembraron a razón de 5.000 células/cm² en las condiciones experimentales utilizadas, las PDC se expandieron mucho mejor que los demás tipos de células cultivados en las mismas condiciones (Tabla 5-1).

Tabla 5-1. Características de crecimiento para las diferentes poblaciones de células cultivadas hasta la senescencia

Tipo de célula	Senescencia	Duplicaciones totales de la población	Rendimiento celular total
MSC	24 días	8	$4,72 \times 10^7$
Células derivadas de tejido adiposo (Artecel, patente de EE.UU. nº 6.555.374)	57 días	24	$4,5 \times 10^{12}$
Fibroblastos	53 días	26	$2,82 \times 10^{13}$
Placenta	80 días	46	$2,49 \times 10^{19}$

Potencial de expansión de los bancos de células a baja densidad. Las células derivadas de la placenta y los fibroblastos se expandieron durante más de 10 pases generando rendimientos celulares de $> 1 \times 10^{11}$ células en 60 días (Tabla 5-2). Al cabo de 60 días en estas condiciones, las células derivadas de la placenta se hicieron senescentes mientras que las poblaciones celulares de fibroblastos experimentaron senescencia después de 80 días, completando > 40 duplicaciones de la población.

Tabla 5-2. Características de crecimiento para las diferentes poblaciones de células mediante expansión por crecimiento a baja densidad desde el pase 10 hasta la senescencia

Tipo de célula (nº de pase)	Senescencia	Duplicaciones totales de la población	Rendimiento celular total
Fibroblasto (P10)	80 días	43,68	$2,59 \times 10^{11}$
de la placenta (P10)	60 días	32,96	$6,09 \times 10^{12}$

Expansión de células derivadas de la placenta a baja densidad a partir de una siembra inicial de células. Se expandieron células derivadas de la placenta a baja densidad (1.000 células/cm²) en matraces o placas recubiertas con gelatina y no recubiertas. El potencial de crecimiento de estas células en estas condiciones fue bueno. Las células se expandieron rápidamente en una fase de crecimiento logarítmico. La velocidad de expansión celular fue similar a la observada cuando las células derivadas de la placenta se sembraron a razón de 5.000 células/cm² en matraces recubiertos con gelatina en medio de crecimiento. No se observaron diferencias en el potencial de expansión celular entre el cultivo en matraces no recubiertos o en matraces recubiertos con gelatina. Las células cultivadas en los matraces recubiertos con gelatina parecían fenotípicamente más pequeñas que las células cultivadas en los matraces no recubiertos.

Expansión de células derivadas de la placenta neonatales o maternas clonales. Puede expandirse una población de células neonatales o maternas clonales a partir de células derivadas de la placenta aisladas del aspecto neonatal o del aspecto materno, respectivamente, de la placenta. Las células se someten a dilución en serie y, a continuación, se siembran en placas recubiertas con gelatina en Medio de crecimiento para la expansión a razón

de 1 célula/pocillo en placas recubiertas con gelatina de 96 pocillos. A partir de esta clonación inicial, se identifican los clones expansivos, se tripsinizan y se vuelven a sembrar en placas recubiertas con gelatina de 12 pocillos en Medio de crecimiento y posteriormente se someten a pases en matraces recubiertos con gelatina T25 a razón de 5.000 células/cm² en Medio de crecimiento. Se realiza la subclonación para asegurar que se ha identificado una población clonal de células. Para los experimentos de subclonación, las células se tripsinizan y se vuelven a sembrar a razón de 0,5 células/pocillo. Los subclones que crecen bien se expanden en matraces T25 recubiertos con gelatina a razón de 5.000 células/cm²/matraz. Las células se someten a pases a razón de 5.000 células/cm²/matraz T75. Se representan gráficamente las características de crecimiento del mejor clon para demostrar la expansión celular. Un análisis del cariotipo puede confirmar que el clon es neonatal o materno.

Resumen. Las condiciones de expansión celular actuales de PDC aisladas en crecimiento a densidades de aproximadamente 5.000 células/cm² en medio de crecimiento en matraces recubiertos con gelatina o no recubiertos, en condiciones normales de oxígeno atmosférico, son suficientes para generar un gran número de células en pase 11. Las PDC también pueden expandirse fácilmente utilizando condiciones de cultivo a menor densidad (por ejemplo, aproximadamente 1.000 células/cm²). Resulta preferente cultivar las células derivadas de la placenta en condiciones atmosféricas normales para generar grandes reservas de células. Las condiciones de cultivo pueden modificarse para conseguir una capacidad de proliferación y/o de diferenciación alternativa de las células derivadas de la placenta.

En las condiciones utilizadas, aunque el potencial de expansión de las MSC y las células derivadas de tejido adiposo es limitado, las células derivadas de la placenta se expanden fácilmente hasta un gran número. Los datos demuestran que las líneas celulares derivadas de la placenta como se desarrollan en el presente documento pueden expandirse más de 40 duplicaciones para proporcionar el número suficiente de células, por ejemplo, para los bancos de células, mientras que no pueden expandirse las células madre mesenquimales para obtener grandes cantidades de células.

Referencias

Hayflick (1974) J. Am. Geriatr. Soc. 22(1):1-12

EJEMPLO 6

Análisis del cariotipo de las células derivadas de la placenta

Las líneas celulares utilizadas en terapia celular son preferentemente homogéneas y carecen de cualquier tipo de células contaminantes. Las células humanas utilizadas en terapia celular deben tener una estructura y número de cromosomas (46) normales. Para identificar las líneas celulares derivadas de la placenta que son homogéneas y carecen de células de origen tisular no placentario, se analizaron los cariotipos de muestras de células.

Materiales y métodos

Se cultivaron PDC de tejido posparto de un neonato varón en Medio de crecimiento (DMEM con bajo contenido de glucosa (Gibco Carlsbad, CA), suero bovino fetal al 15% (v/v) (FBS) (Hyclone, Logan, UT), betamercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma, St. Louis, MO) y 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin (Gibco, Carlsbad, CA)). Se seleccionó tejido posparto de un neonato varón (X,Y) para permitir la distinción entre las células de origen neonatal y las células de origen materno (X,X). Las células se sembraron a razón de 5.000 células/cm² en Medio de crecimiento en un matraz T25 (Corning, Corning, NY) y se expandieron hasta aproximadamente el 80% de confluencia. Se llenó hasta el cuello con Medio de crecimiento un matraz T25 que contenía las células. Las muestras se enviaron a un laboratorio de citogenética clínica por mensajería (el tiempo estimado de transporte de laboratorio a laboratorio es de una hora). El análisis cromosómico fue realizado por el Center for Human & Molecular Genetics de la New Jersey Medical School, Newark, NJ. Las células se analizaron durante la metafase, momento en el que los cromosomas se visualizan mejor. De veinte células en metafase contadas, se analizaron cinco para determinar un número de cariotipo homogéneo normal (dos). Una muestra de células se caracterizaba como homogénea si se observaban dos cariotipos. Una muestra de células se caracterizaba como heterogénea si se observaban más de dos cariotipos. Se realizaba el recuento y se analizaban células en metafase adicionales cuando se identificaba un número de cariotipo heterogéneo (cuatro).

Resultados

Se interpretó que todas las muestras de células enviadas para el análisis cromosómico presentaban una apariencia normal. Tres de las trece líneas celulares analizadas presentaron un fenotipo heterogéneo (XX y XY) que indicaba la presencia de células procedentes de ambos orígenes neonatal y materno (Tabla 6-1). Se aislaron células derivadas del tejido Placenta-N del aspecto neonatal de la placenta. En el pase cero, esta línea celular parecía XY homogénea. Sin embargo, en el pase nueve, la línea celular era heterogénea (XX/XY), lo que indicaba una presencia anterior no detectada de células de origen materno.

Tabla 6-1. Análisis del cariotipo de las PDC

Tejido	pase	Células en metafase contadas	Células en metafase analizadas	Número de cariotipos	Cariotipo ISCN
Placenta	22	20	5	2	46,XX
Placenta	2	20	5	2	46, XX
Placenta-N	0	20	5	2	46, XY
Placenta-V	0	20	5	2	46, XY
Placenta-M	0	21	5	4	46, XY[18]/46, XX[3]
Placenta-M	4	20	5	2	46,XX
Placenta-N	9	25	5	4	46, XY[5]/46, XX[20]
Placenta-N C1	1	20	5	2	46, XY
Placenta-N C3	1	20	6	4	46, XY[2]/46, XX[18]
Placenta-N C4	1	20	5	2	46, XY
Placenta-N C15	1	20	5	2	46, XY
Placenta-N C20	1	20	5	2	46, XY
Placenta-N C22	1	20	5	2	46, XY

Leyenda: N- lado neonatal; V- zona de las vellosidades; M- lado materno; C- clon

Resumen. El análisis cromosómico identificó células derivadas de la placenta cuyos cariotipos parecían normales según la interpretación de un laboratorio de citogenética clínica. El análisis del cariotipo también identificó líneas celulares sin células maternas, determinado por un cariotipo homogéneo.

EJEMPLO 7

Evaluación de marcadores de superficie de células derivadas de la placenta humana mediante citometría de flujo

Puede utilizarse la caracterización de proteínas de superficie celular o "marcadores" mediante citometría de flujo para determinar la identidad de una línea celular. La uniformidad 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 derivadas de la placenta (mediante citometría de flujo), proporcionando un perfil para la identificación de estas líneas celulares.

Materiales y métodos

Medios. Las células se cultivaron en Medio de crecimiento (DMEM con bajo contenido de glucosa (Gibco Carlsbad, CA) suero bovino fetal al 15% (v/v) (FBS); (Hyclone, Logan, UT), betamercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma, St. Louis, MO) y 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomina (Gibco, Carlsbad, CA)).

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

Tinción con anticuerpos. Las células adherentes de los matraces se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS); (Gibco, Carlsbad, CA) y se desprendieron con tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, CA). Las células se recolectaron, se centrifugaron y se resuspendieron en FBS al 3% (v/v) en PBS a una concentración celular de 1×10^7 por mililitro. Según las especificaciones del fabricante, se añadió a cien microlitros de suspensión celular anticuerpo contra el marcador de superficie celular de interés (Tabla 7-1) y la mezcla se incubó en oscuridad durante 30 minutos a 4°C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar el anticuerpo no unido. Las células se resuspendieron en 500 microlitros de PBS y se analizaron mediante 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).

Anticuerpos contra marcadores de superficie celular. Se utilizaron los siguientes anticuerpos contra marcadores de superficie celular.

Tabla 7-1. Anticuerpos contra marcadores de superficie celular

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

Comparación entre países. Las células derivadas de la placenta se analizaron en los países 8, 15 y 20.

Comparación entre donantes. Para comparar las diferencias entre los donantes, se compararon entre sí células de la placenta de diferentes donantes.

Comparación del recubrimiento de superficie. Las células derivadas de la placenta cultivadas en matraces recubiertos con gelatina se compararon con las células derivadas de la placenta cultivadas en matraces no recubiertos.

Comparación de enzimas de digestión. Se compararon cuatro tratamientos utilizados para el aislamiento y la preparación de las células. Se compararon las células aisladas de la placenta mediante tratamiento con 1) colagenasa; 2) colagenasa/dispsa; 3) colagenasa/hialuronidasa; y 4) colagenasa/hialuronidasa/dispsa.

Comparación de la capa placentaria. Se compararon las células aisladas del aspecto materno del tejido placentario con las células aisladas de la zona de las vellosidades del tejido placentario y las células aisladas del aspecto fetal neonatal de la placenta.

Resultados

Caracterización de células derivadas de la placenta. Las células derivadas de la placenta analizadas mediante citometría de flujo demostraron ser positivas para la producción de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, indicado por el aumento de los valores de fluorescencia con respecto al control IgG. Estas células fueron negativas para la producción detectable de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ, indicado por los valores de fluorescencia comparable a los del control IgG. Se consideraron las variaciones de los valores de fluorescencia de las curvas positivas. Aunque la media (es decir, CD13) y el rango (es decir, CD90) de las curvas positivas presentaron cierta variación, las curvas parecían normales, lo que confirma una población homogénea, y presentaron valores de fluorescencia superiores a los del control IgG.

Comparación entre países. Las células derivadas de la placenta en los países 8, 15 y 20 analizadas mediante citometría de flujo fueron positivas para la producción de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, como se refleja en el aumento del valor de la fluorescencia con respecto al control IgG. Las células fueron negativas para la producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ, como indican los valores de fluorescencia coherentes con el control IgG.

Comparación entre donantes. Las células derivadas de la placenta aisladas a partir de distintos donantes analizadas mediante citometría de flujo expresaron cada uno de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, con valores de fluorescencia aumentados con respecto al control IgG. Las células fueron negativas para la producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ como indica el valor de fluorescencia coherente con el control IgG.

El efecto del recubrimiento de superficie con gelatina. Las células derivadas de la placenta expandidas en matraces recubiertos con gelatina o no recubiertos analizadas mediante citometría de flujo expresaron CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, que se refleja en el aumento de los valores de fluorescencia con respecto al control IgG. Estas células fueron negativas para la producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ indicado por unos valores de fluorescencia coherentes con el control IgG.

Efecto del procedimiento de digestión enzimática sobre el perfil del marcador de superficie celular.

Las PDC aisladas utilizando diversas enzimas de digestión analizadas mediante citometría de flujo expresaron CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, como indica el aumento de los valores de fluorescencia con respecto al control IgG. Estas células fueron negativas para la producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ como indican los valores de fluorescencia coherentes con el control IgG.

Comparación de capa de la placenta. Las células aisladas de las capas materna, de las vellosidades y neonatal de la placenta, respectivamente, analizadas mediante citometría de flujo dieron positivo para la producción de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, como indica el aumento del valor de la fluorescencia con respecto al control IgG. Estas células fueron negativas para la producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ como indican los valores de fluorescencia coherentes con el control IgG.

Resumen. El análisis de las células derivadas de la placenta mediante citometría de flujo ha establecido un perfil útil para identificar estas líneas celulares. Las células derivadas de la placenta 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 era coherente entre variaciones en las variables, incluidas el donante, el pase, el recubrimiento de superficie del recipiente de cultivo, las enzimas de digestión y la capa de la placenta. Se observó cierta variación en las medias y los rangos de la curva del histograma del valor de fluorescencia individuales, pero todas las curvas positivas en todas las condiciones ensayadas fueron normales y expresaron valores de fluorescencia superiores a los del control IgG, lo que confirma que las células comprenden una población homogénea que tiene expresión positiva de los marcadores.

EJEMPLO 8**Análisis de células derivadas de la placenta mediante matrices GeneChip® de Affymetrix**

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

Materiales y métodos**Aislamiento y cultivo de las células**

Células derivadas de tejido posparto. Se obtuvieron placenta y cordones umbilicales humanos del National Disease Research Interchange (NDRI, Filadelfia, PA) de partos normales a término con el consentimiento de la paciente. Se recibieron los tejidos y se aislaron las células tal como se describe en el Ejemplo 1. Las células se cultivaron en Medio de crecimiento (medio esencial modificado de Dulbecco (DMEM con bajo contenido de glucosa; Invitrogen, Carlsbad, CA) con suero bovino fetal al 15% (v/v) (Hyclone, Logan UT), 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA) y 2-mercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma, St. Louis MO)) en matraces de plástico de cultivo tisular recubiertos con gelatina. Los cultivos se incubaron en condiciones normales de crecimiento.

Fibroblastos. Se adquirieron fibroblastos dérmicos humanos de Cambrex Incorporated (Walkersville, MD; número de lote 9F0844) y se obtuvieron de la ATCC CRL-1501 (CCD39SK). Ambas líneas se cultivaron en medio DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA) con suero bovino fetal al 10% (v/v) (Hyclone) y 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomycin (Invitrogen). Las células se cultivaron sobre plástico tratado con tejido convencional.

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

Células de médula ósea de cresta ilíaca (ICBM) humanas. Se recibió médula ósea de cresta ilíaca humana del NDRI con el consentimiento del paciente. La médula ósea se procesó según el método esbozado por Ho, *et al.* (publicación internacional PCT n° WO03/025149). La médula se mezcló con tampón de lisis (NH₄Cl 155 micromolar, KHCO₃ 10 micromolar y EDTA 0,1 micromolar, pH 7,2) en una relación de 1 parte de médula ósea y 20 partes de tampón de lisis. La suspensión celular se agitó en vórtex, se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente, y se centrifugó durante 10 minutos a 500 x g. Se desechó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en Medio Esencial Mínimo alfa (Invitrogen) complementado con suero bovino fetal al 10% (v/v) y glutamina 4 micromolar. Se centrifugaron las células y se resuspendió el sedimento celular en medio recién preparado. Se realizó el recuento de las células mononucleares viables mediante exclusión con azul de tripano (Sigma, St. Louis, MO). Las células mononucleares se sembraron en matraces de plástico de cultivo tisular a razón de 5 x 10⁴ células/cm². Las células se incubaron a 37°C con CO₂ al 5%, a una concentración normal de O₂ atmosférico o de O₂

al 5%. Las células se cultivaron durante 5 días sin cambio de medio. Los medios y las células no adherentes se eliminaron al cabo de 5 días de cultivo. Las células adherentes se mantuvieron en cultivo.

Aislamiento de ARNm y análisis GeneChip. Se eliminaron de los matraces los cultivos de células en crecimiento activo con un raspador de células en solución salina tamponada con fosfato (PBS) fría. Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 300 x g. Se eliminó el sobrenadante, y las células se resuspendieron en PBS recién preparado y se centrifugaron de nuevo. Se eliminó el sobrenadante, y el sedimento celular se congeló inmediatamente y se almacenó a -80°C. Se extrajo el ARNm celular y se transcribió a ADNc. A continuación, el ADNc se transcribió a ARNc y se marcó con biotina. El ARNc marcado con biotina se hibridó con una matriz de oligonucleótidos HG-U133A GENECHIP (Affymetrix, Santa Clara CA). La hibridación y la recogida de datos se realizaron según las especificaciones del fabricante. Los análisis se realizaron mediante el software informático "Significance Analysis of Microarrays" (SAM) versión 1.21 (Universidad de Stanford; Tusher, V.G. *et al.*, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 98: 5116-5121).

Resultados

En este estudio se analizaron catorce poblaciones diferentes de células. Las células, junto con la información del pase, el sustrato de cultivo y los medios de cultivo, se enumeran en la Tabla 8-1.

Tabla 8-1. Células analizadas mediante el estudio de micromatrices. Las líneas celulares se enumeran por sus códigos de identificación junto con el pase en el momento del análisis, el sustrato de crecimiento celular y los medios de crecimiento.

Población celular	Pase	Sustrato	Medios
Umbilical (022803)	2	Gelatina	DMEM, FBS al 15%, BME
Umbilical (042103)	3	Gelatina	DMEM, FBS al 15%, BME
Umbilical (071003)	4	Gelatina	DMEM, FBS al 15%, BME
Placenta (042203)	12	Gelatina	DMEM, FBS al 15%, BME
Placenta (042903)	4	Gelatina	DMEM, FBS al 15%, BME
Placenta (071003)	3	Gelatina	DMEM, FBS al 15%, BME
ICBM (070203) (O ₂ al 5%)	3	Plástico	MEM FBS al 10%
ICBM (062703) (O ₂ normal)	5	Plástico	MEM FBS al 10%
ICBM (062703) (O ₂ al 5%)	5	Plástico	MEM FBS al 10%
hMSC (Lote 2F1655)	3	Plástico	MSCGM
hMSC (Lote 2F1656)	3	Plástico	MSCGM
hMSC (Lote 2F1657)	3	Plástico	MSCGM
Fibroblasto h. (9F0844)	9	Plástico	DMEM-F12, FBS al 10%
Fibroblasto h. (ATCC CRL-1501)	4	Plástico	DMEM-F12, FBS al 10%

Los datos se evaluaron mediante un Análisis de Componentes Principales, analizando los 290 genes que se expresaron de manera diferencial en las células. Este análisis permite una comparación relativa de las similitudes entre las poblaciones. La Tabla 8-2 muestra las distancias euclidianas que se calcularon para la comparación de los pares de células. Las distancias euclidianas se basaron en la comparación de las células en base a los 290 genes que se expresaron de manera diferencial entre los tipos de células. La distancia euclidiana es inversamente proporcional a la similitud entre la expresión de los 290 genes.

Tabla 8-2. Las distancias euclidianas para los pares de células.
La distancia euclidiana se calculó para los tipos de células utilizando los 290 genes que se expresaron de manera diferencial entre los tipos de células.
La similitud entre las células es inversamente proporcional a la distancia euclidiana.

Par de células	Distancia euclidiana
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 8-3, 8-4 y 8-5 muestran la expresión de los genes aumentada en las células derivadas de la placenta (Tabla 8-3), aumentada en las células derivadas de cordón umbilical (Tabla 8-4), y reducida en las células derivadas de cordón umbilical y de la placenta (Tabla 8-5). La columna titulada "ID del conjunto de sondas" se refiere al código de identificación del fabricante para los conjuntos de varias sondas de oligonucleótidos situadas en un sitio particular en la matriz, que hibridan con el gen nombrado (columna "Nombre del gen"), que comprende una secuencia que puede encontrarse dentro de la base de datos del NCBI (GenBank) en el número de registro especificado (columna "Número de registro del NCBI").

Tabla 8-3. Genes que demostraron tener una expresión específicamente aumentada en las células derivadas de la placenta en comparación con las demás líneas celulares ensayadas.

Genes aumentados en las células derivadas de la placenta		
ID del conjunto de sondas	Nombre del gen	Número de registro del NCBI
209732_at	Lectina de tipo C (dependiente de calcio, dominio de reconocimiento de carbohidratos), miembro 2 de la superfamilia (inducida por activación)	AF070642
206067_s_at	tumor de Wilms 1	NM_024426
207016_s_at	familia de aldehído deshidrogenasa 1, miembro A2	AB015228
206367_at	renina	NM_000537
210004_at	receptor 1 de lipoproteína de baja densidad oxidada (tipo lectina)	AF035776
214993_at	<i>Homo sapiens</i> , clon IMAGE:4179671, ARNm, cds parcial	AF070642
202178_at	proteína quinasa C, zeta	NM_002744
209780_at	proteína hipotética DKFZp564F013	AL136883
204135_at	regulada por disminución en el cáncer de ovario 1	NM_014890
213542_at	ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp547K1113 (del clon DKFZp547K1113)	AI246730

Tabla 8-4. Genes que demostraron tener una expresión específicamente aumentada en las células derivadas de cordón umbilical en comparación con las demás líneas celulares ensayadas.

Genes aumentados en las células derivadas de cordón umbilical		
ID del conjunto de sondas	Nombre del gen	Número de registro del NCBI
202859_x_at	interleucina 8	NM_000584
211506_s_at	interleucina 8	AF043337
210222_s_at	reticulón 1	BC000314
204470_at	ligando 1 de quimiocina (motivo C-X-C) (actividad estimuladora del crecimiento de melanoma)	NM_001511
206336_at	ligando 6 de quimiocina (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica para granulocitos)	NM_002993
207850_at	ligando 3 de quimiocina (motivo C-X-C)	NM_002090
203485_at	reticulón 1	NM_021136
202644_s_at	factor de necrosis tumoral, proteína 3 inducida por alfa	NM_006290

Tabla 8-5. Genes que demostraron tener una expresión disminuida en las células derivadas de cordón umbilical y de la placenta, en comparación con las demás líneas celulares ensayadas.

Genes disminuidos en las células derivadas de cordón umbilical y de la placenta			
ID del conjunto de sondas	Nombre del gen	Número de registro del NCBI	
5	210135_s_at	caja homeótica 2 de la baja estatura	AF022654.1
	205824_at	proteína 2 de choque térmico de 27 kDa	NM_001541.1
	209687_at	ligando 12 de quimiocina (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células del estroma)	U19495.1
10	203666_at	ligando 12 de quimiocina (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células del estroma)	NM_000609.1
	212670_at	elastina (estenosis aórtica supra valvular, síndrome de Williams-Beuren)	AA479278
	213381_at	ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022)	N91149
15	206201_s_at	caja homeótica 2 de mesénquima (caja homeótica específica de la detención del crecimiento)	NM_005924.1
	205817_at	homólogo 1 de caja homeótica de "sine oculis" (<i>Drosophila</i>)	NM_005982.1
	209283_at	cristalina, alfa B	AF007162.1
	212793_at	activador de morfogénesis 2 asociado a "dishevelled"	BF513244
20	213488_at	proteína DKFZP586B2420	AL050143.1
	209763_at	similar a neuralin 1	AL049176
	205200_at	tetranectina (proteína de unión a plasminógeno)	NM_003278.1
	205743_at	dominio tres de homología con src (SH3) y rico en cisteínas	NM_003149.1
25	200921_s_at	gen 1 de translocación de linfocitos B, antiproliferativa	NM_001731.1
	206932_at	colesterol 25-hidroxilasa	NM_003956.1
	204198_s_at	factor de transcripción 3 relacionado con el enanismo	AA541630
	219747_at	proteína hipotética FLJ23191	NM_024574.1
30	204773_at	receptor de interleucina 11, alfa	NM_004512.1
	202465_at	potenciador de procolágeno C-endopeptidasa	NM_002593.2
	203706_s_at	homólogo 7 de "frizzled" (<i>Drosophila</i>)	NM_003507.1
	212736_at	gen hipotético BC008967	BE299456
	214587_at	colágeno, tipo VIII, alfa 1	BE877796
35	201645_at	tenascina C (hexabraquion)	NM_002160.1
	210239_at	proteína 5 de caja homeótica de "iroquois"	U90304.1
	203903_s_at	hefaestina	NM_014799.1
	205816_at	integrina, beta 8	NM_002214.1
40	203069_at	glicoproteína 2 de vesícula sináptica	NM_014849.1
	213909_at	ADNc de <i>Homo sapiens</i> FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744	AU147799
	206315_at	factor 1 similar al receptor de citocinas	NM_004750.1
45	204401_at	canal de potasio activado por calcio de conductancia intermedia/baja, subfamilia N, miembro 4	NM_002250.1
	216331_at	integrina, alfa 7	AK022548.1
	209663_s_at	integrina, alfa 7	AF072132.1
	213125_at	proteína DKFZP586L151	AW007573
50	202133_at	coactivador de la transcripción con motivo de unión a PDZ (TAZ)	AA081084
	206511_s_at	homólogo 2 de caja homeótica de "sine oculis" (<i>Drosophila</i>)	NM_016932.1
	213435_at	proteína KIAA1034	AB028957.1
	206115_at	respuesta de crecimiento precoz 3	NM_004430.1
	213707_s_at	caja homeótica de "distal-less" 5	NM_005221.3
55	218181_s_at	proteína hipotética FLJ20373	NM_017792.1
	209160_at	familia 1 de aldo-ceto reductasas, miembro C3 (3-alfa hidroxiesteroide deshidrogenasa, tipo II)	AB018580.1
	213905_x_at	biglicano	AA845258
	201261_x_at	biglicano	BC002416.1
60	202132_at	coactivador de la transcripción con motivo de unión a PDZ (TAZ)	AA081084
	214701_s_at	fibronectina 1	AJ276395.1
	213791_at	proencefalina	NM_006211.1

ES 2 569 780 T3

205422_s_at	integrina, tipo beta 1 (con dominios de repetición similares a EGF)	NM_004791.1
214927_at	inserto de longitud completa de ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; clon de ADNc EUROIMAGE 1968422	AL359052.1
206070_s_at	EphA3	AF213459.1
212805_at	proteína KIAA0367	AB002365.1
219789_at	receptor de péptido natriurético C/guanilato ciclasa C (receptor del péptido atrial natriurético C)	A1628360
219054_at	proteína hipotética FLJ14054	NM_024563.1
213429_at	ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222)	AW025579
204929_s_at	proteína de membrana asociada a vesículas 5 (miobrevina)	NM_006634.1
201843_s_at	proteína 1 de la matriz extracelular tipo fibulina que contiene EGF	NM_004105.2
221478_at	similar a proteína 3 de interacción con BCL2/adenovirus E1B de 19 kDa	AL132665.1
201792_at	proteína 1 de unión a AE	NM_001129.2
204570_at	polipéptido 1 de la subunidad VIIa de la citocromo c oxidasa (músculo)	NM_001864.1
201621_at	neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1	NM_005380.1
202718_at	proteína 2 de unión al factor de crecimiento insulinoide, 36 kDa	NM_000597.1

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

Tabla 8-6. Genes que demostraron tener una expresión aumentada en los fibroblastos en comparación con las demás líneas celulares ensayadas.

Genes aumentados en fibroblastos	
	Fosfatasa 2 de doble especificidad
	Proteína KIAA0527
	ADNc de <i>Homo sapiens</i> : FLJ23224 fis, clon ADSU02206
	Dineína, citoplasmática, polipéptido intermedio 1
	Anquirina 3, nódulo de Ranvier (anquirina G)
	Inhibina, beta A (activina A, activina AB, polipéptido alfa)
	Ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 4 (función supuesta)
	Proteína KIAA1053
	Proteína 1A asociada a microtúbulos
	Proteína con dedos de zinc 41
	Proteína HSPC019
	ADNc de <i>Homo sapiens</i> : FLJ23564 fis, clon LNG10773
	ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp564A072 (del clon DKFZp564A072)
	Proteína LIM (similar a enigma de unión a proteína quinasa C de rata)
	Inhibidor del potenciador del gen del polipéptido de cadena ligera kappa en linfocitos B, proteína asociada al complejo quinasa
	Proteína hipotética FLJ22004
	Secuencia de ARNm humano (clon CTG-A4)
	ESTs, Moderadamente similar al factor 2 similar al receptor de citocinas; precursor CRL2 del receptor de citocinas [<i>Homo sapiens</i>]
	Factor de crecimiento transformante, beta 2
	Proteína hipotética MGC29643
	Antígeno identificado por el anticuerpo monoclonal MRC OX-2

Tabla 8-7. Genes que demostraron tener una expresión aumentada en las células derivadas de ICBM en comparación con las demás líneas celulares ensayadas.

Genes aumentados en células ICBM	
	Proteína de repetición de anquirina cardiaca
	ORF de la región de MHC de clase I
5	Integrina, alfa 10
	Proteína hipotética FLJ22362
	UDP-N-acetil-alfa-D-galactosamina:polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 3 (GalNAc-T3)
	Proteína 44 inducida por interferón
10	SRY (región determinante del sexo del cromosoma Y)-caja 9 (displasia campomélica, reversión sexual autosómica)
	Proteína asociada a queratina 1-1
	Tipo hipocalcina 1
	Jagged 1 (síndrome de Alagille)
15	Proteoglicano 1, gránulo de secreción

Tabla 8-8. Genes que demostraron tener una expresión aumentada en las células MSC en comparación con las demás líneas celulares ensayadas.

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

Resumen. Se realizó un análisis GENECHIP para proporcionar una caracterización molecular de las células posparto derivadas de placenta. Este análisis incluyó células derivadas de tres placentas diferentes. El estudio también incluyó tres líneas diferentes de células derivadas de cordón umbilical, dos líneas diferentes de fibroblastos dérmicos, tres líneas de células madre mesenquimales y tres líneas de células de médula ósea de cresta ilíaca. Se analizó el ARNm expresado por estas células mediante GENECHIP de Affymetrix que contenía sondas de oligonucleótidos para 22.000 genes.

Los resultados demostraron que 290 genes se expresaban de manera diferencial en estos cinco tipos de células diferentes. Estos genes incluyen diez genes que están aumentados específicamente en las células derivadas de la placenta. Se descubrió que cincuenta y cuatro genes tenían niveles de expresión específicamente inferiores en la placenta.

La expresión de los genes seleccionados se ha confirmado mediante PCR en el Ejemplo 9. Estos resultados demuestran que las células derivadas de la placenta tienen un perfil de expresión génica distinto, por ejemplo, en comparación con las células derivadas de médula ósea y los fibroblastos.

EJEMPLO 9

Marcadores celulares en células derivadas de la placenta

Se evaluaron las similitudes y diferencias de la expresión génica entre células derivadas de placenta humana y células derivadas de otras fuentes comparando sus perfiles de expresión génica mediante una matriz Genechip de Affymetrix. Se identificaron seis genes "firma": receptor 1 de LDL oxidada, interleucina-8, renina, reticulón, ligando 3 del receptor de quimiocinas (ligando 3 de CXCL3), y proteína quimiotáctica para granulocitos 2 (GCP-2). Estos genes "firma" se expresaron a niveles relativamente altos en las células derivadas de la placenta. Este análisis se llevó a cabo para verificar los datos de micromatrices y para hallar la concordancia/discordancia entre la expresión de genes y de proteínas, así como para establecer varios ensayos fiables para la detección de identificadores únicos para las células derivadas de la placenta.

Métodos y materiales

5 **Células.** Se cultivaron células derivadas de la placenta (tres aislados, incluido un aislado predominantemente neonatal identificado mediante análisis del cariotipo) y fibroblastos dérmicos normales humanos (NHDF; neonatal y adulto), en Medio de crecimiento (DMEM con bajo contenido de glucosa (Gibco, Carlsbad, CA), suero bovino fetal al 15% (v/v) (nº de cat. SH30070.03; Hyclone, Logan, UT), beta-mercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma, St. Louis, MO), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomina (Gibco, Carlsbad, CA)) en un matraz T75 recubierto con gelatina. Se cultivaron células madre mesenquimales (MSC) en un medio Mesenchymal Stem Cell Growth Medium BulletKit (MSCGM; Cambrex, Walkerville, MD).

15 Para el experimento de IL-8, se descongelaron las células del nitrógeno líquido y se sembraron en matraces recubiertos con gelatina a razón de 5.000 células/cm², se cultivaron durante 48 horas en Medio de crecimiento, y, a continuación, se cultivaron durante 8 horas en 10 mililitros de medio de privación de suero (DMEM con bajo contenido de glucosa (Gibco, Carlsbad, CA), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomina (Gibco, Carlsbad, CA) y albúmina de suero bovino al 0,1% (p/v) (BSA; Sigma, St. Louis, MO)). Después de este tratamiento, se extrajo el ARN y los sobrenadantes se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos para eliminar los restos celulares.

20 **Cultivo celular para el ensayo ELISA.** Se cultivaron células derivadas de la placenta y fibroblastos humanos derivados de prepucio neonatal humano en Medio de crecimiento, en matraces T75 recubiertos con gelatina. Las células se congelaron en fase 11 en nitrógeno líquido. Las células se descongelaron y se transfirieron a tubos de centrifuga de 15 mililitros. Después de la centrifugación a 150 x g durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 4 mililitros de medio de cultivo y se realizó el recuento. Las células se cultivaron en un matraz de 75 cm² que contenía 15 mililitros de Medio de crecimiento a 375.000 células/matraz durante 24 horas. El medio se cambió a un medio de privación de suero durante 8 horas. Se recogió el medio de privación de suero al final de la incubación, se centrifugó a 14.000 x g durante 5 minutos, y se almacenó a -20°C.

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

35 **Ensayo ELISA.** Se analizó la cantidad de IL-8 secretada por las células en el medio de privación de suero mediante ensayos ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN). Todos los ensayos se analizaron según las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

40 **Aislamiento de ARN total.** Se extrajo el ARN de los fibroblastos y las células derivadas de la placenta confluentes para la expresión de IL-8 de las células tratadas como se ha descrito anteriormente. Las células se lisaron con 350 microlitros de tampón RLT que contenía betamercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO) según las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit; Qiagen, Valencia, CA). Se extrajo el ARN según las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit; Qiagen, Valencia, CA) y se sometió a tratamiento con ADNasa (2,7 U/muestra) (Sigma St. Louis, MO). El ARN se eluyó con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se almacenó a -80°C. Se extrajo el ARN de placenta humana. Se suspendió el tejido (30 miligramos) en 700 microlitros de tampón RLT que contenía beta-mercaptoetanol. Las muestras se homogeneizaron mecánicamente, y la extracción del ARN trascurrió según las especificaciones del fabricante. El ARN se extrajo con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se almacenó a -80°C.

50 **Transcripción inversa.** Se realizó la transcripción inversa del ARN mediante hexámeros aleatorios con los reactivos de transcripción inversa TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) a 25°C durante 10 minutos, 37°C durante 60 minutos, y 95°C durante 10 minutos. Las muestras se almacenaron a -20°C.

55 Los genes que se determinó, mediante micromatriz de ADNc, que estaban regulados de manera exclusiva en las células posparto ("genes firma" incluidos receptor de LDL oxidada, interleucina-8, renina y reticulón), se investigaron adicionalmente utilizando PCR en tiempo real y convencional.

60 **PCR en tiempo real.** Se realizó una PCR en muestras de ADNc utilizando los productos de expresión génica ASSAYS-ON-DEMAND: se mezclaron receptor de LDL oxidada (Hs00234028); renina (Hs00166915); reticulón (Hs00382515); ligando 3 de CXC (Hs00171061); GCP-2 (Hs00605742); IL-8 (Hs00174103); y GAPDH, con ADNc y TaqMan Universal PCR Master Mix según las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando un sistema de detección de secuencias "ABI PRISM 7000 Sequence Detection System" con el software ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las condiciones del termociclador 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 nº2 del sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700 de Applied Biosystems).

PCR convencional. Se realizó una PCR convencional con un ABI PRISM 7700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Boston, MA) para confirmar los resultados de la PCR en tiempo real. La PCR se realizó utilizando 2 microlitros de solución de ADNc, 1 x TAQ Polymerase (nombre comercial AMPLITAQ GOLD), tampón de reacción Universal Mix PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA), y desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos. Se optimizó la amplificación 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 la renina (94°C durante 15 segundos, 53°C durante 15 segundos y 72°C durante 30 segundos durante 38 ciclos); para el receptor de LDL oxidada y GAPDH (94°C durante 15 segundos, 55°C durante 15 segundos y 72°C durante 30 segundos durante 33 ciclos). Los cebadores utilizados para la amplificación se enumeran en la Tabla 9-1. La concentración de cebador en la reacción de PCR final fue 1 micromolar a excepción de GAPDH, que fue 0,5 micromolar. Los cebadores de GAPDH fueron los mismos que en la PCR en tiempo real, salvo porque no se añadió la sonda TaqMan del fabricante a la reacción de PCR final. Las muestras se procesaron en gel de agarosa al 2% (p/v) y se tiñeron con bromuro de etidio (Sigma, St. Louis, MO). Las imágenes se capturaron con una película 667 Universal Twinpack (VWR International, South Plainfield, NJ) utilizando una cámara POLAROID con distancia focal (VWR International, South Plainfield, NJ).

Tabla 9-1: Cebadores utilizados

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

Inmunofluorescencia. Las células se fijaron con paraformaldehído frío al 4% (p/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se utilizaron células derivadas de la placenta en pase 0 (P0) (un aislado, directamente después del aislamiento) y en pase 11 (P11) (dos aislados) y fibroblastos (P11). Se realizó la inmunocitoquímica utilizando anticuerpos dirigidos contra los siguientes epítomos: vimentina (1:500; Sigma, St. Louis, MO), desmina (1:150; Sigma - generada contra conejo; ó 1:300; Chemicon, Temecula, CA - generada contra ratón), alfa actina de músculo liso (SMA; 1:400; Sigma), citoqueratina 18 (CK18; 1:400; Sigma), factor de von Willebrand (vWF; 1:200; Sigma), y CD34 (CD34 humana clase III; 1:100; DAKOCytomation, Carpinteria, CA). Además, se ensayaron los siguientes marcadores en células derivadas de la placenta en pase 11: anti-GRO-alfa humana - PE (1:100; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), anti-GCP-2 humana (1:100; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), anti-receptor 1 de LDL oxidada humana (ox-LDL R1; 1:100; Santa Cruz Biotech), y anti-NOGA-A humana (1:100; Santa Cruz, Biotech).

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

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

Preparación de células para el análisis FACS. Las células adherentes de los matraces se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) y se desprendieron con tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, CA). Las células se recolectaron, se centrifugaron y se resuspendieron en FBS al 3% (v/v) en PBS a una concentración celular de 1×10^7 /mililitro. Se llevaron alícuotas de cien microlitros a tubos cónicos. Las células teñidas para los antígenos intracelulares se permeabilizaron con tampón Perm/Wash (BD Pharmingen, San Diego, CA). Se añadió a las alícuotas el anticuerpo según las especificaciones del fabricante, y las células se incubaron en oscuridad durante 30 minutos a 4°C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar el anticuerpo sobrante. Las células que necesitaban un anticuerpo secundario se resuspendieron en 100 microlitros de FBS al 3%. El anticuerpo secundario se añadió según las especificaciones del fabricante, y las células se incubaron en 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 sobrante. Las células lavadas se resuspendieron en 0,5 mililitros de PBS y se analizaron mediante citometría de flujo. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: receptor 1 de LDL oxidada (sc-5813; Santa Cruz, Biotech), GRO α (555042; BD Pharmingen, Bedford, MA), IgG1 kappa de ratón, (P-4685 y M-5284; Sigma), e IgG de burro contra cabra (sc-3743; Santa Cruz, Biotech).

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

Resultados

Los resultados de la PCR en tiempo real para los genes "firma" seleccionados realizada sobre ADNc de células derivadas de fibroblastos adultos y neonatales, células madre mesenquimales (MSC) y placentas humanas, indican que tanto el receptor de LDL oxidada como la renina se expresaban a un nivel más alto en las células derivadas de la placenta en comparación con otras células. Los datos obtenidos a partir de la PCR en tiempo real se analizaron mediante el método $\Delta\Delta C_T$ 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 las células derivadas de la placenta y los controles. El ligando 3 de CXC se expresaba a niveles muy bajos. GCP-2 se expresaba a niveles comparables con los de los fibroblastos adultos y neonatales humanos. Los resultados de la PCR en tiempo real se confirmaron mediante PCR convencional. La secuenciación de los productos de PCR validó adicionalmente estas observaciones. No se encontraron diferencias significativas en el nivel de expresión del ligando 3 de CXC entre las células posparto y los controles utilizando los cebadores de ligando 3 de CXC de PCR convencional que figuran en la Tabla 9-1.

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

Cuando se examinaron los sobrenadantes de las células cultivadas en medio sin suero para la presencia de IL-8, las mayores cantidades se detectaron en los medios procedentes de determinados aislados de células de placenta (Tabla 9-2). No se detectó IL-8 en el medio procedente de fibroblastos dérmicos humanos.

Tabla 9-2. Producción de proteína IL-8 medida mediante ELISA

Tipo de célula	IL-8
Fibroblastos humanos	ND
Aislado de placenta 1	ND
Aislado de placenta 2	ND
Aislado de placenta 3 (O ₂ a concentración normal)	17,27±8,63
Aislado de placenta 3 (O ₂ a baja concentración sin BME)	264,92±9,88
Resultados del ensayo ELISA para la interleucina-8 (IL-8) realizados en células derivadas de la placenta y fibroblastos dérmicos humanos. Los valores que se presentan son picogramos/millón de células, n=2, eem.	
ND: no detectado	

Se examinaron las células derivadas de la placenta para la producción del receptor de LDL oxidada, GCP-2 y GRO α mediante análisis FACS. Las células dieron positivo para GCP-2. No se detectaron receptor de LDL oxidada ni GRO α mediante este método.

Las células derivadas de la placenta también se ensayaron para la producción de proteínas seleccionadas mediante análisis inmunocitoquímico. Inmediatamente después del aislamiento (pase 0), las células derivadas de la placenta humana se fijaron con paraformaldehído al 4% 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 mostraron tinción positiva para alfa actina de músculo liso y para vimentina. Este patrón se conservó hasta el pase 11. Sólo unas pocas células (< 5%) en pase 0 mostraron tinción positiva para la citoqueratina 18.

También se investigaron mediante inmunocitoquímica las células derivadas de la placenta en pase 11 para la producción de GROalfa y GCP-2. Las células derivadas de la placenta fueron positivas para GCP-2, pero no se detectó producción de GROalfa mediante este método.

5 **Resumen.** Se ha establecido la concordancia entre los niveles de expresión génica medidos mediante micromatrices y PCR (tanto en tiempo real como convencional) para cuatro genes: receptor 1 de LDL oxidada, renina, reticulón e IL-8. La expresión de estos genes estaba regulada de manera diferencial a nivel de ARNm en las células derivadas de la placenta, estando regulada la IL-8 también de manera diferencial a nivel de proteínas. No se detectó la presencia de receptor de LDL oxidada a nivel de proteínas mediante análisis FACS en las células derivadas de la placenta. No se confirmó la expresión diferencial de GCP-2 ni ligando 3 de CXC a nivel de ARNm; sin embargo, se detectó GCP-2 a nivel de proteínas mediante análisis FACS en las células derivadas de la placenta. Aunque este resultado puede no estar totalmente en concordancia con los datos obtenidos del experimento de micromatrices, la falta de coherencia puede deberse simplemente a diferencias de sensibilidad de las metodologías.

15 Inmediatamente después del aislamiento (pase 0), las células derivadas de la placenta humana mostraron tinción positiva para alfa actina de músculo liso y para vimentina. Este patrón también se observó en las células en pase 11. Estos resultados sugieren que la producción de vimentina y alfa actina de músculo liso se conserva en las células durante los pases, por ejemplo, en el Medio de crecimiento utilizado en el presente documento.

20 **EJEMPLO 10**

Caracterización inmunohistoquímica del fenotipo de PDC

25 Se analizaron mediante inmunohistoquímica los fenotipos de las células que se encuentran en tejidos placentarios humanos.

Materiales y métodos

30 **Preparación de tejidos.** Se recolectó tejido de placenta humana y se fijó por inmersión en paraformaldehído al 4% (p/v) durante la noche a 4°C. La inmunohistoquímica se realizó utilizando anticuerpos dirigidos contra los siguientes epítomos (véase la Tabla 10-1): vimentina (1:500; Sigma, St. Louis, MO), desmina (1:150, generada contra conejo; Sigma; ó 1:300, generada contra ratón; Chemicon, Temecula, CA), alfa actina de músculo liso (SMA; 1:400; Sigma), citoqueratina 18 (CK18; 1:400; Sigma), factor de von Willebrand (vWF; 1:200; Sigma) y CD34 (CD34 humana clase III; 1:100; DAKOCytomation, Carpintería, CA). Además, se ensayaron 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 oxidada humana (ox-LDL R1; 1:100; Santa Cruz Biotech), y anti-NOGO-A humana (1:100; Santa Cruz Biotech). Las muestras fijadas se recortaron con un bisturí y se colocaron dentro del compuesto de inclusión OCT (Tissue-Tek OCT; Sakura, Torrance, CA) en un baño de hielo seco que contenía etanol. A continuación, se cortaron los bloques congelados (10 micrómetros de espesor) con un criostato convencional (Leica Microsystems) y se montaron en portaobjetos de vidrio para la tinción.

Tabla 10-1: Resumen de los anticuerpos primarios utilizados

Anticuerpo	Concentración	Proveedor
Vimentina	1:500	Sigma, St. Louis, MO
Desmina (rb)	1:150	Sigma
Desmina (m)	1:300	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
CD34 III	1:100	DakoCytomation, Carpintería, CA
GROalfa-PE	1:100	BD, Franklin Lakes, NJ
GCP-2	1:100	Santa Cruz Biotech
Ox-LDL R1	1:100	Santa Cruz Biotech
NOGO-A	1:100	Santa Cruz Biotech

60 **Inmunohistoquímica.** Se realizó la inmunohistoquímica como en estudios anteriores (por ejemplo, Messina, *et al.* (2003) *Exper. Neurol.* 184:816-829). Las secciones de tejido se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una solución de bloqueo de proteínas que contenía PBS, suero de cabra al 4% (v/v) (Chemicon, Temecula, CA) y Triton al 0,3% (v/v) (Triton X-100; Sigma) durante 1 hora para tener acceso a los antígenos intracelulares. En los casos en los que el epítomo de interés se encontraba en la superficie celular (CD34, ox-LDL R1), se omitió el Triton en todas las etapas del procedimiento con el fin de evitar la pérdida del epítomo. Además, en los casos en los que el anticuerpo primario se generó contra cabra (GCP-2, ox-LDL R1, NOGO-A), se utilizó suero de burro al 3% (v/v) en lugar de suero de cabra durante todo el procedimiento. A

continuación, se aplicaron a los cortes los anticuerpos primarios, diluidos en solución de bloqueo, durante un período de 4 horas a temperatura ambiente. Se eliminaron las soluciones de anticuerpo primario, y los cultivos se lavaron con PBS antes de aplicar las soluciones de anticuerpo secundario (1 hora a temperatura ambiente) que contenían solución de bloqueo junto con IgG de cabra contra ratón - Texas Red (1:250; Molecular Probes, Eugene, OR) y/o IgG de cabra contra conejo - Alexa 488 (1:250; Molecular Probes) o IgG de burro contra cabra - FITC (1:150; Santa Cruz Biotech). Los cultivos se lavaron, y se aplicó DAPI 10 micromolar (Molecular Probes) durante 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.

Después de la inmunotinción, se visualizó la fluorescencia con el filtro de fluorescencia apropiado en un microscopio de epifluorescencia invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). La tinción positiva estaba representada por una señal de fluorescencia superior a la de la tinción de control. Se capturaron imágenes representativas con una cámara de vídeo digital en color y el software ImagePro (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para las muestras con triple tinción, cada imagen se tomó utilizando un solo filtro de emisión a la vez. A continuación, se prepararon montajes en capas utilizando el software Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA).

Resultados

Caracterización de la placenta. Se observaron vimentina, desmina, SMA, CK18, vWF y CD34 dentro de la placenta y eran específicas de zona.

Expresión tisular de GROalfa, GCP-2, ox-LDL R1 y NOGO-A. No se observó ninguno de estos marcadores dentro del tejido placentario.

Resumen. En las células que se encuentran en la placenta humana se expresan vimentina, desmina, alfa actina de músculo liso, citoqueratina 18, factor de von Willebrand y CD34.

EJEMPLO 11

Inmunología *in vitro*

Se evaluaron líneas celulares posparto *in vitro* en cuanto a sus características inmunitarias en un esfuerzo por predecir la respuesta inmunitaria, de haberla, que estas células inducirían tras el trasplante *in vivo*. Se analizaron líneas celulares posparto mediante citometría de flujo para la producción de HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86 y B7-H2. Estas proteínas son expresadas por las células presentadoras de antígenos (APC) y son necesarias para la estimulación directa de los linfocitos T CD4⁺ vírgenes (Abbas y Lichtman, CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY, 5ª ed. (2003) Saunders, Philadelphia, p. 171). También se analizaron las líneas celulares mediante citometría de flujo para la producción de HLA-G (Abbas y Lichtman, CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY, 5ª ed. (2003) Saunders, Philadelphia, p. 171), CD178 (Coumans, *et al.*, (1999) Journal of Immunological Methods 224, 185-196), y PD-L2 (Abbas y Lichtman, CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY, 5ª ed. (2003) Saunders, Philadelphia, p 171; Brown, *et al.* (2003) The Journal of Immunology 170, 1257-1266). Se cree que la producción de estas proteínas por parte de las células que se encuentran en los tejidos placentarios interviene en el estado inmunoprivilegiado de los tejidos placentarios *in utero*. Para predecir el grado en que las líneas celulares derivadas de la placenta inducen una respuesta inmunitaria *in vivo*, las líneas celulares se ensayaron en una reacción linfocitaria mixta (MLR) unidireccional.

Materiales y métodos

Cultivo celular. Las células se cultivaron en Medio de crecimiento (DMEM con bajo contenido de glucosa (Gibco, Carlsbad, CA), suero bovino fetal al 15% (v/v) (FBS); (Hyclone, Logan, UT), betamercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma, St. Louis, MO), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin (Gibco, Carlsbad, CA)) hasta la confluencia en matraces T75 (Corning, Corning, NY) recubiertos con gelatina al 2% (Sigma, St. Louis, MO).

Tinción con anticuerpos. Las células se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) y se desprendieron con tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, CA). Las células se recolectaron, se centrifugaron y se resuspendieron en FBS al 3% (v/v) en PBS a una concentración celular de 1×10^7 por mililitro. Se añadió anticuerpo (Tabla 11-1) a cien microlitros de suspensión celular según las especificaciones del fabricante y se incubó en oscuridad durante 30 minutos a 4°C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar el anticuerpo no unido. Las células se resuspendieron en quinientos microlitros de PBS y se analizaron mediante citometría de flujo utilizando un instrumento FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Tabla 11-1. Anticuerpos

Anticuerpo	Fabricante	Número de catálogo
HLA-DRDPDQ	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555558
CD80	BD Pharmingen (San Diego, CA)	557227
CD86	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555665
B7-H2	BD Pharmingen (San Diego, CA)	552502
HLA-G	Abcam (Cambridgeshire, Reino Unido)	ab 7904-100
CD 178	Santa Cruz (San Cruz, CA)	sc-19681
PD-L2	BD Pharmingen (San Diego, CA)	557846
IgG2a de ratón	Sigma (St. Louis, MO)	F-6522
IgG1kappa de ratón	Sigma (St. Louis, MO)	P-4685

Reacción linfocitaria mixta. Se enviaron al CTBR (Senneville, Quebec), en hielo seco, viales crioconservados de PDC derivadas de placenta de pase 11 marcadas como línea celular B, para llevar a cabo una reacción linfocitaria mixta utilizando CTBR SOP nº CAC-031. Se recogieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de múltiples donantes voluntarios varones y mujeres. Se trataron con mitomicina C, PBMC alogénicas estimuladoras (donante), PBMC autólogas, y líneas celulares derivadas de placenta. Se añadieron células estimuladoras autólogas y tratadas con mitomicina C a PBMC respondedoras (receptores) y se cultivaron durante 4 días. Después de la incubación, se añadió a cada muestra [³H]timidina y se cultivaron durante 18 horas. Después de recolectar las células, se extrajo el ADN marcado radiactivamente, y se midió la incorporación de [³H]-timidina con un contador de centelleo.

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

Resultados

Reacción linfocitaria mixta - placenta. Se sometieron a criba siete donantes de sangre voluntarios humanos para identificar un solo donante alogénico que presentara una fuerte respuesta de proliferación en una reacción linfocitaria mixta con los otros seis donantes de sangre. Este donante se seleccionó como el donante alogénico de control positivo. Los seis donantes de sangre restantes se seleccionaron como receptores. El donante alogénico de control positivo y las líneas celulares de placenta se trataron con mitomicina C y se cultivaron en una reacción linfocitaria mixta con los seis receptores alogénicos individuales. Las reacciones se realizaron por triplicado utilizando dos placas de cultivo celular con tres receptores por placa (Tabla 11-2). El índice medio de estimulación varió entre 1,3 (placa 2) y 3 (placa 1) y los donantes alogénicos de control positivo variaron entre 46,25 (placa 2) y 279 (placa 1) (Tabla 11-3).

Tabla 11-2. Datos de la reacción linfocitaria mixta - Línea celular B (placenta)

DMP para el ensayo de proliferación									
ID de placa: Placa 1									
Número del análisis	Sistema de cultivo	Repeticiones			Media	DE	CV		
		1	2	3					

(continua)

5	IM03-7769	Valor basal de la proliferación del receptor	79	119	138	112,0	30,12	26,9
		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	241	272	175	229,3	49,54	21,6
10		Donante alogénico de MLR IM03-7768 (tratadas con mitomicina C)	23971	22352	20921	22414,7	1525,97	6,8
		MLR con línea celular (célula tipo B tratada con mitomicina C)	664	559	1090	771,0	281,21	36,5
15	SI (donante)				200			
	SI (línea celular)				7			
20	IM03-7770	Valor basal de la proliferación del receptor	206	134	262	200,7	64,17	32,0
		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	1091	602	524	739,0	307,33	41,6
25		Donante alogénico de MLR IM03-7768 (tratadas con mitomicina C)	45005	43729	44071	44268,3	660,49	1,5
		MLR con línea celular (célula tipo B tratada con mitomicina C)	533	2582	2376	1830,3	1128,24	61,6
30	SI (donante)				221			
	SI (línea celular)				9			
35	IM03-7771	Valor basal de la proliferación del receptor	157	87	128	124,0	35,17	28,4
		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	293	138	508	313,0	185,81	59,4
40		Donante alogénico de MLR IM03-7768 (tratadas con mitomicina C)	24497	34348	31388	30077,7	5054,53	16,8
		MLR con línea celular (célula tipo B tratada con mitomicina C)	601	643	a	622,0	29,70	4,8
45	SI (donante)				243			
	SI (línea celular)				5			
50	IM03-7772	Valor basal de la proliferación del receptor	56	98	51	68,3	25,81	37,8
		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	133	120	213	155,3	50,36	32,4
55		Donante alogénico de MLR IM03-7768 (tratadas con mitomicina C)	14222	20076	22168	18822,0	4118,75	21,9
		MLR con línea celular (célula tipo B tratada con mitomicina C)	a	a	a	a	a	a
60	SI (donante)				275			
	SI (línea celular)				a			
65	IM03-7768	Valor basal de la proliferación del receptor	84	242	208	178,0	83,16	46,7
	(donante alogénico)	Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina)	361	617	304	427,3	166,71	39,0

(continua)

5									
	Línea celular tipo B	Valor basal de la proliferación del receptor	126	124	143		131,0	10,44	8,0
10		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina)	822	1075	487		794,7	294,95	37,1
	ID de placa: Placa 2								
15	Número del análisis	Sistema de cultivo	Repeticiones				Media	DE	CV
			1	2	3				
	IM03-7773	Valor basal de la proliferación del receptor	908	181	330		473,0	384,02	81,2
20		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	269	405	572		415,3	151,76	36,5
		Donante alogénico de MLR IM03-7768 (tratadas con mitomicina C)	29151	28691	28315		28719,0	418,70	1,5
25		MLR con línea celular (célula tipo B tratada con mitomicina C)	567	732	905		734,7	169,02	23,0
	SI (donante)					61			
30	SI (línea celular)					2			
	IM03-7774	Valor basal de la proliferación del receptor	893	1376	185		818,0	599,03	73,2
35		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	261	381	568		403,3	154,71	38,4
		Donante alogénico de MLR IM03-7768 (tratadas con mitomicina C)	53101	42839	48283		48074,3	5134,18	10,7
40		MLR con línea celular (célula tipo B tratada con mitomicina C)	515	789	294		532,7	247,97	46,6
	SI (donante)					59			
45	SI (línea celular)					1			
	IM03-7775	Valor basal de la proliferación del receptor	1272	300	544		705,3	505,69	71,7
50		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	232	199	484		305,0	155,89	51,1
		Donante alogénico de MLR IM03-7768 (tratadas con mitomicina C)	23554	10523	28965		21014,0	9479,74	45,1
55		MLR con línea celular (célula tipo B tratada con mitomicina C)	768	924	563		751,7	181,05	24,1
	SI (donante)					30			
60	SI (línea celular)					1			

65

(continua)

5	IM03-7776	Valor basal de la proliferación del receptor	1530	137	1046	904,3	707,22	78,2
10		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	420	218	394	344,0	109,89	31,9
15		Donante alogénico de MLR IM03-7768 (tratadas con mitomicina C)	28893	32493	34746	32044,0	2952,2 ₂	9,2
		MLR con línea celular (célula tipo B tratada con mitomicina C)	a	a	a	a	a	a
	SI (donante)				35			
	SI (línea celular)				a			

Tabla 11-3. Índice medio de estimulación de células de la placenta y un donante alogénico en una reacción linfocitaria mixta con seis receptores alogénicos individuales.

Índice medio de estimulación		
	Receptor	Placenta
Placa 1 (receptores 1-3)	279	3
Placa 2 (receptores 4-6)	46,25	1,3

Marcadores de células presentadoras de antígenos - Placenta. Los histogramas de las células derivadas de la placenta analizadas mediante citometría de flujo son negativos para la producción de HLA-DR, DP, DQ, CD80, CD86 y B7-H2, como indica el valor de fluorescencia coherente con el control IgG, lo que indica que las líneas celulares placentarias carecen de las moléculas de superficie celular necesarias para estimular directamente las PBMC alogénicas (por ejemplo, linfocitos T CD4⁺).

Marcadores de inmunomodulación - Placenta. Los histogramas de las células derivadas de la placenta analizadas mediante citometría de flujo son positivos para la producción de PD-L2, como indica el aumento del valor de fluorescencia con respecto al control IgG, y son negativos para la producción de CD178 y HLA-G, como indica el valor de fluorescencia coherente con el control IgG.

Resumen. En las reacciones linfocitarias mixtas llevadas a cabo con líneas celulares derivadas de la placenta, el índice medio de estimulación variaba entre 1,3 y 3, y el de los controles positivos alogénicos variaba entre 46,25 y 279. Las líneas celulares derivadas de la placenta fueron negativas para la producción de las proteínas estimuladoras HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86 y B7-H2, medido mediante citometría de flujo. Las líneas celulares derivadas de la placenta fueron negativas para la producción de las proteínas inmunomoduladoras HLA-G y CD178, y positivas para la producción de PD-L2, medido mediante citometría de flujo. Las PBMC del donante alogénico contienen células presentadoras de antígenos que expresan HLA-DP, DR, DQ, CD80, CD86 y B7-H2, permitiendo de este modo la estimulación de las PBMC alogénicas (por ejemplo, linfocitos T CD4⁺ vírgenes). La ausencia de moléculas de superficie celular presentadoras de antígenos en las células derivadas de la placenta necesarias para la estimulación directa de las PBMC alogénicas (por ejemplo, linfocitos T CD4⁺ vírgenes) y la presencia de PD-L2, una proteína inmunomoduladora, puede explicar el bajo índice de estimulación presentado por estas células en una MLR en comparación con los controles alogénicos.

EJEMPLO 12

Secreción de factores tróficos por las células derivadas de la placenta

Se midió la secreción de factores tróficos seleccionados de las PDC. Se seleccionaron factores con actividad angiogénica (es decir, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (Rosen *et al.* (1997) Ciba Found. Symp. 212:215-26), proteína 1 quimiotáctica para monocitos (MCP-1) (Salcedo *et al.* (2000) Blood 96; 34-40), interleucina-8 (IL-8) (Li *et al.* (2003). J. Immunol. 170:3369-76), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Hughes *et al.* (2004). Ann. Thorac. Surg. 77:812-8), inhibidor tisular de metaloproteínasa de matriz 1 (TIMP1), angiopoyetina 2 (ANG2), factor de crecimiento plaquetario (PDGF-bb), trombopoyetina (TPO), factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF), factor 1 alfa derivado de células del estroma (SDF-1alfa)), actividad neurotrófica/neuroprotectora (factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)) (Cheng *et al.* (2003) Dev. Biol. 258:319-33), interleucina-6 (IL-6), proteína

quimiotáctica para granulocitos 2 (GCP-2), factor de crecimiento transformante beta 2 (TGFbeta2)), o actividad quimiocina (proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP 1a), proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (MIP1b), proteína quimiotáctica para monocitos 1 (MCP-1), Rantes (expresada y secretada por el linfocito T normal en función de su grado de activación), I309, quimiocina regulada por el timo y por activación (TARC), eotaxina, quimiocina derivada de macrófagos (MDC), IL-8).

Métodos y materiales

Cultivo celular. Se cultivaron PDC derivadas de la placenta y fibroblastos humanos derivados de prepucio neonatal humano en Medio de crecimiento (DMEM con bajo contenido de glucosa (Gibco, Carlsbad, CA), suero bovino fetal al 15% (v/v) (SH30070.03; Hyclone, Logan, UT), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin (Gibco)) en matraces T75 recubiertos con gelatina. Las células se crioconservaron en pase 11 y se almacenaron en nitrógeno líquido. Después de descongelar las células, se añadió a las células Medio de crecimiento, seguido de transferencia a un tubo de centrifuga de 15 mililitros y centrifugación de las células a 150 x g durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante. El sedimento celular se resuspendió en 4 mililitros de Medio de crecimiento, y se realizó el recuento de las células. Las células se sembraron a razón de 5.000 células/cm² en un matraz T75 que contenía 15 mililitros de Medio de crecimiento y se cultivaron durante 24 horas. El medio se cambió a un medio sin suero (DMEM con bajo contenido de glucosa (Gibco), albúmina de suero bovino al 0,1% (p/v) (Sigma), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin (Gibco)) durante 8 horas. El medio sin suero acondicionado se recogió al final de la incubación mediante centrifugación a 14.000 x g durante 5 minutos y se almacenó 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 utilizando 2 mililitros de tripsina/EDTA (Gibco). La actividad de la tripsina se inhibió añadiendo 8 mililitros de Medio de crecimiento. Las células se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante, y las células se resuspendieron en 1 mililitro de Medio de crecimiento. Se estimó el número de células mediante un hemocitómetro.

Ensayo ELISA. Las células se cultivaron a 37°C en dióxido de carbono al 5% y oxígeno atmosférico. Las PDC (aislado 3) también se cultivaron en oxígeno al 5% o beta-mercaptoetanol (BME). La cantidad de MCP-1, IL-6, VEGF, SDF-1alfa, GCP-2, IL-8 y TGF-beta2 producida por cada muestra de células se midió mediante un ensayo ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN). Todos los ensayos se realizaron según las instrucciones del fabricante. Los valores presentados son picogramos/mililitro/millón de células (n = 2, eem).

Ensayo ELISA multiplexado SEARCHLIGHT. Las quimiocinas (MIP1a, MIP1b, MCP-1, Rantes, I309, TARC, eotaxina MDC, IL-8), BDNF, y los factores angiogénicos (HGF, KGF, bFGF, VEGF, TIMP1, ANG2, PDGF-bb, TPO, HB-EGF) se midieron mediante matrices de proteinoma SearchLight (Pierce Biotechnology Inc.). Las matrices de proteinoma son ensayos ELISA de tipo sándwich multiplexados para la medición cuantitativa de dos a 16 proteínas por pocillo. Las matrices se producen salpicando un patrón de 2 x 2, 3 x 3 ó 4 x 4 de cuatro a 16 anticuerpos de captura diferentes en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Después de un procedimiento ELISA de tipo sándwich, se forma la imagen de toda la placa para capturar la señal quimioluminiscente generada en cada mancha dentro de cada pocillo de la placa. La cantidad de señal generada en cada mancha es proporcional a la cantidad de proteína diana en la muestra o estándar original.

Resultados

Ensayo ELISA. MCP-1 e IL-6 eran secretadas por las PDC derivadas de la placenta y los fibroblastos dérmicos (Tabla 12-1). SDF-1 alfa era secretada por las células derivadas de la placenta cultivadas en O₂ al 5% y por los fibroblastos. GCP-2 e IL-8 eran secretadas por las células derivadas de la placenta cultivadas en presencia de BME u O₂ al 5%. GCP-2 también era secretada por los fibroblastos humanos. No puedo detectarse TGF-beta2 mediante el ensayo ELISA.

Tabla 12-1. Resultados del ensayo ELISA

	MCP-1	IL-6	VEGF	SDF-1 alfa	GCP-2	IL-8	TGF-beta2
Fibroblasto	17±1	61±3	29±2	19±1	21±1	ND	ND
Placenta - aislado 1	60±3	41±2	ND	ND	ND	ND	ND
Placenta - aislado 2	125±16	10±1	ND	ND	ND	ND	ND
Placenta - aislado 3, + BME	21±10	67±3	ND	ND	44±9	17±9	ND
Placenta - aislado 3, + O ₂ al 5%, sin BME	77±16	339±21	ND	1149±137	54±2	265±10	ND

Leyenda: ND: no detectado.

Ensayo ELISA multiplexado SEARCHLIGHT. TIMP1, TPO, KGF, HGF, HBEGF, BDNF, MIP1a, MCP-1, RANTES, TARC, eotaxina e IL-8 eran secretadas por las células derivadas de la placenta (Tablas 12-2 y 12-3). No se detectaron Ang2, VEGF ni PDGF-bb.

Tabla 12-2. Resultados del ensayo ELISA multiplexado SEARCHLIGHT

	TIMP1	ANG2	PDGFbb	TPO	KGF	HGF	FGF	VEGF	HBEGF	BDNF
hFB	19306,3	ND	ND	230,5	5,0	ND	ND	27,9	1,3	ND
P1	24299,5	ND	ND	546,6	8,8	16,4	ND	ND	3,8	ND
P3	14176,8	ND	ND	568,7	5,2	10,2	ND	ND	1,9	33,6

Leyenda: hFB (fibroblastos humanos), P1 (células derivadas de la placenta - aislado 1), P3 (células derivadas de la placenta - aislado 3). ND: No detectado.

Tabla 12-3. Resultados del ensayo ELISA multiplexado SEARCHLIGHT

	MIP1a	MIP1b	MCP1	RANTES	I309	TARC	Eotaxina	MDC	IL-8
hFB	ND	ND	39,6	ND	ND	0,1	ND	ND	204,9
P1	79,5	ND	228,4	4,1	ND	3,8	12,2	ND	413,5
P3	ND	ND	102,7	ND	ND	0,4	ND	ND	63,8

Leyenda: hFB (fibroblastos humanos), P1 (células derivadas de la placenta - aislado 1), P3 (células derivadas de la placenta - aislado 3). ND: No detectado.

Resumen. Las células derivadas de la placenta secretaron varios factores tróficos. Algunos de estos factores tróficos, tales como HGF, MCP-1 e IL-8, desempeñan papeles importantes en la angiogénesis. Otros factores tróficos, tales como BDNF e IL-6, tienen papeles importantes en la regeneración neural.

EJEMPLO 13

Ensayo de coagulación de plasma

La terapia celular puede inyectarse sistémicamente para determinadas aplicaciones en las que las células son capaces de dirigirse al sitio de acción. Es importante que las células inyectadas no provoquen trombosis, que puede ser fatal. El factor tisular, una glicoproteína 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 tisular también desempeña un papel importante en la formación de los vasos embrionarios, por ejemplo, en la formación de la pared vascular primitiva (Brodsky *et al.* (2002) Exp. Nephrol. 10:299-306). Para determinar el potencial de las PPDC para iniciar la coagulación, se evaluaron PPDC derivadas de la placenta para la producción de factor tisular y su capacidad para iniciar la coagulación del plasma.

Métodos y materiales

Factor tisular humano. Se reconstituyó factor tisular humano SIMPLASTIN (Organon Tekailca Corporation, Durham, NC) con 20 mililitros de agua destilada. Se realizaron diluciones en serie de la solución madre (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 almacenó en hielo antes de su uso. Se añadieron a cada pocillo de una placa de 96 pocillos 100 microlitros de solución salina tamponada con fosfato (PBS), 10 microlitros de SIMPLASTIN diluido (excepto un pocillo testigo), 30 microlitros de cloruro cálcico 0,1 molar, y 100 microlitros de plasma humano normal. La placa se colocó inmediatamente en un lector de microplacas con temperatura controlada y se midió la absorbancia a 405 nanómetros a intervalos de 40 segundos durante 30 minutos.

Células J-82 y derivadas de la placenta. Se cultivaron células J-82 (ATCC, MD) en medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM; Gibco, Carlsbad, CA) que contenía suero bovino fetal al 10% (v/v) (FBS; Hyclone, Logan UT), piruvato sódico 1 milimolar (Sigma Chemical, St. Louis, MO), L-glutamina 2 milimolar (Mediatech Herndon, VA), 1 x aminoácidos no esenciales (Mediatech Herndon, VA). Al llegar a aproximadamente un 70% de confluencia, las células se transfirieron a los pocillos de una placa de 96 pocillos a razón de 100.000, 50.000 y 25.000 células/pocillo. Las células derivadas de la placenta se cultivaron en Medio de crecimiento (DMEM con bajo contenido de glucosa (Gibco), FBS al 15% (v/v), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomina (Gibco), y betamercaptoetanol al 0,001% (Sigma)) en matraces T75 recubiertos con gelatina (Corning, Corning, NY). Se transfirieron a los pocillos células derivadas de la placenta en pase 5 a razón de 50.000 células/pocillo. Se eliminó de cada pocillo el medio de cultivo después de la centrifugación a 150 x g durante 5 minutos. Las células se suspendieron en PBS sin calcio ni magnesio.

Inhibición del factor tisular. La inhibición de la reacción de coagulación mediante la preincubación de las células con CNTO 859, un anticuerpo para el factor tisular, demuestra que el factor tisular es responsable de la coagulación. Las células se incuban con 20 microgramos/mililitro de CNTO 859 (Centocor, Malvern, PA) durante 30 minutos. Se añade a cada pocillo cloruro cálcico (30 microlitros). La placa se coloca inmediatamente en un lector de

microplacas con temperatura controlada y se mide la absorbancia a 405 nanómetros a intervalos de 40 segundos durante 30 minutos. Las células se lavan en PBS y se desprenden del matraz con tripsina/EDTA (Gibco Carlsbad, CA). Las células se recolectan, se centrifugan y se resuspenden en FBS al 3% (v/v) en PBS a una concentración celular de 1×10^7 por mililitro. Se añade anticuerpo a 100 microlitros de suspensión celular según las especificaciones del fabricante, y las células se incuban en oscuridad durante 30 minutos a 4°C. Después de la incubación, las células se lavan con PBS y se centrifugan a 150 x g durante 5 minutos para eliminar el anticuerpo no unido. Las células se resuspenden en 100 microlitros de FBS al 3% y se añade anticuerpo secundario según las instrucciones del fabricante. Las células se incuban en oscuridad durante 30 minutos a 4°C. Después de la incubación, las células se lavan con PBS y se centrifugan para eliminar el anticuerpo secundario no unido. Las células lavadas se resuspenden en 500 microlitros de PBS y se analizan mediante citometría de flujo.

Resultados

El análisis de citometría de flujo puso de manifiesto que las células posparto derivadas de la placenta expresan factor tisular. Las células derivadas de la placenta aumentaban la velocidad de coagulación como indica el tiempo hasta la mitad de la absorbancia máxima ($T_{1/2}$ a máx, Tabla 13-1). La $T_{1/2}$ a máx es inversamente proporcional al número de células J82.

Tabla 13-1. Se evaluó el efecto del factor tisular humano (SIMPLASTIN) y las células derivadas de la placenta (Pla) sobre la coagulación del plasma. Como unidad de medida se utilizó el tiempo hasta la mitad de la absorbancia máxima ($T_{1/2}$ a máx) en la meseta en segundos.

Dilución de SIMPLASTIN	$T_{1/2}$ 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
Pla P5	
50.000	757

Resumen. Las células derivadas de la placenta expresan factor tisular. El factor tisular se encuentra normalmente en las células en una conformación que es inactiva, pero que se activa mediante estrés mecánico o químico (por ejemplo, LPS) (Sakariassen *et al.* (2001) *Thromb. Res.* 104:149-74; Engstad *et al.* (2002) *Int. Immunopharmacol.* 2:1585-97). Por lo tanto, la minimización del estrés durante el proceso de preparación de las PDC puede evitar la activación del factor tisular. Además de la actividad trombogénica, el factor tisular se ha asociado con la actividad angiogénica. Por lo tanto, la actividad del factor tisular puede ser beneficiosa cuando las células derivadas de la placenta se trasplantan en tejido, pero debe inhibirse cuando las PDC se inyectan por vía intravenosa.

Ejemplo 14

Diferenciación de las células derivadas de la placenta a hepatocitos

Se examinaron diversas condiciones para determinar una combinación adecuada de medios básicos y factores de crecimiento para la diferenciación de las células derivadas de la placenta a hepatocitos. Se seleccionaron HNF-1 alfa, un factor de transcripción específico de hepatocitos, proteínas filamentosas intermedias citoplasmáticas 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, alfa-fetoproteína (alfaFP) y albúmina, 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; Chagraoui *et al.* (2003) *Blood* 101(8):2973-2982).

Métodos y materiales

Se cultivaron células derivadas de la placenta aisladas según el método descrito en el Ejemplo 1, así como fibroblastos dérmicos humanos normales neonatales o adultos (NHDF), en Medio de crecimiento (DMEM con bajo contenido de glucosa (Gibco, Carlsbad, CA), suero bovino fetal al 15% (v/v) (nº de cat. SH30070.03; Hyclone, Logan UT), beta-mercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma, St. Louis, MO), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomina (Gibco)), en un matraz T75 recubierto con gelatina. El factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), la oncostatina M, el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el factor de células madre (SCF) y el factor de crecimiento de fibroblastos 4 (FGF 4) eran de PeproTech Inc. (Rocky Hill, NJ). El factor de crecimiento plaquetario BB (PDGF-BB) era de R&D Systems (Minneapolis, MN).

Se ensayaron las siguientes condiciones:

Método 1

Células derivadas de la placenta (P2) (predominantemente neonatales mediante análisis del cariotipo), fibroblastos dérmicos humanos normales neonatales y adultos (NHDF). Las células se sembraron a razón de $22,5 \times 10^3$ células/cm² en MATRIGEL al 1% (BD Discovery Labware, Bedford, MA) (Becton-Dickinson y Co., Franklin Lakes, NJ) en medio sin suero (DMEM con bajo contenido de glucosa al 60% (v/v)) (DMEM-LG; Gibco, Carlsbad, CA), MCDB-201 al 40% (v/v) (Sigma, St. Louis, MO), complementado con 1x 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), 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 unidades/mililitro de estreptomina (Gibco), FCS al 2% (v/v) (Hyclone Laboratories, Logan, UT), y 10 nanogramos/mililitro de cada uno de EGF y PDGF-BB. Al cabo de 8 a 12 horas, se eliminó el medio, las células se lavaron dos veces con PBS (Gibco) y se cultivaron en el medio anteriormente descrito sin EGF ni PDGF-BB, pero complementado 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). Las células se cultivaron en atmósfera normal con CO₂ al 5% a 37°C.

Método 2

Células derivadas de la placenta (P2) (predominantemente neonatales mediante análisis del cariotipo), NHDF neonatales y adultos. Las células se sembraron a razón de 22.500 células/cm² en placas de 24 pocillos recubiertas con gelatina y se cultivaron como se ha descrito anteriormente.

Método 3

Células derivadas de la placenta (P10), NHDF adultos, células derivadas de la placenta (P3). Las células se sembraron a densidad elevada (50.000 células/cm²) en placas de TCP de 24 pocillos y se cultivaron en DMEM (Gibco), complemento B27 (Gibco), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomina, 20 nanogramos/mililitro de HGF y/o 10 nanogramos/mililitro de FGF-4. Las células se cultivaron en estas condiciones durante 4 semanas.

Método 4

Células derivadas de la placenta (P3), células derivadas de la placenta (P15), células derivadas de la placenta (P2) (predominantemente neonatales mediante análisis del cariotipo), células derivadas de la placenta (P5) (predominantemente neonatales mediante análisis del cariotipo), células derivadas de la placenta (P5) (predominantemente maternas mediante análisis del cariotipo), NHDF neonatales y adultos. Las células se sembraron a una densidad de 5.000 células/cm² en matraces T25 en medio Chang C (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) en fibronectina (Peprotech, Rocky Hill, NJ) o en gelatina (Sigma) y se cultivaron durante dos pases hasta la confluencia. A continuación, las células se sembraron a razón de 1.000 células/cm² en placas TCPS de 24 pocillos y se cultivaron como se ha descrito anteriormente hasta que alcanzaron aproximadamente un 40%-60% de confluencia.

Método 5

Células derivadas de la placenta (P2) (predominantemente neonatales mediante análisis del cariotipo) y NHDF adultos. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos en gelatina en Medio de crecimiento complementado con 1 nanogramo/mililitro o con 10 nanogramos/mililitro de oncostatina M (Chagraoui (2003) Blood 101(8): 2973-2982). Las células se cultivaron en estas condiciones durante 4 semanas.

Método 6

Células derivadas de la placenta (P2) (predominantemente neonatales mediante análisis del cariotipo) y NHDF adultos. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos en gelatina en Medio de crecimiento complementado con 10 nanogramos/mililitro de 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 el ARN de las células derivadas de la placenta y los fibroblastos cultivados 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 se extrajo el ARN según las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA) con un tratamiento de 2,7 unidades/muestra de ADNasa (Sigma). El ARN se eluyó con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se almacenó a -80°C. El ARN se sometió a transcripción inversa utilizando hexámeros aleatorios con los reactivos de transcripción inversa TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA) a 25°C durante 10 minutos, 37°C durante 60 minutos, y 95°C durante 10 minutos. Las muestras se almacenaron a -20°C.

PCR en tiempo real. Se realizó una PCR en muestras de ADNc utilizando los productos de expresión génica ASSAYS-ON-DEMAND para albúmina (Hs00609411), citocromo p450 2B6 (Hs00167937), GAPDH (Applied Biosystems, Foster City, CA) y TaqMan Universal PCR Master Mix según las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando un 7000 Sequence Detection System con el software ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las condiciones del termociclador 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 nº2 de Applied Biosystems para el sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700).

Inmunofluorescencia. Los cultivos celulares se fijaron con paraformaldehído frío al 4% (p/v) durante un período de 10 minutos a temperatura ambiente. La inmunocitoquímica se realizó utilizando anticuerpos dirigidos contra los siguientes epítomos: queratina 8 (K8; 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 solución de bloqueo de proteínas que contenía PBS, suero de cabra al 4% (v/v) (Chemicon, Temecula, CA), y Triton al 0,3% (v/v) (Triton X-100, Sigma) durante 30 minutos para acceder a los antígenos intracelulares. En los casos en los que el epítomo de interés se encontraba en la superficie celular (c-met), se omitió el Triton en todas las etapas del procedimiento con el fin de evitar la pérdida del epítomo. A continuación, se aplicaron a los cultivos los anticuerpos primarios, diluidos en solución de bloqueo, durante un período de 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se eliminaron las soluciones de anticuerpo primario y los cultivos se lavaron con PBS antes de aplicar las soluciones de anticuerpo secundario (1 hora a temperatura ambiente) que contenían solución de bloqueo junto con IgG de cabra contra ratón - Texas Red (1:250; Molecular Probes, Eugene, OR) para K8, K19, CK18, vimentina y albúmina, IgG de cabra contra conejo - Alexa 488 (1:250; Molecular Probes) para desmina y c-met, o IgG de burro contra 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.

Después de la inmunotinción, se visualizó la fluorescencia mediante un filtro de fluorescencia apropiado en un microscopio de epifluorescencia invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). Se capturaron imágenes representativas con una cámara de vídeo digital en color y el software ImagePro (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para las muestras con triple tinción, cada imagen se tomó utilizando solamente un filtro de emisión a la vez. A continuación, se prepararon montajes en capas utilizando el software Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA).

Resultados

Con el fin de determinar si las células derivadas de la placenta podían expresar marcadores epiteliales, las células se cultivaron en medio Chang C. Las células derivadas de la placenta (P4), (P3) y (P8) se cultivaron en medio Chang C durante 11 días. Las células derivadas de la placenta mostraron tinción positiva para citoqueratina 18 mediante análisis de inmunocitoquímica. Ninguna de las muestras mostró tinción positiva para queratina 8. Las muestras cultivadas en Medio de crecimiento fueron negativas para ambos marcadores.

Se investigó el efecto de los pases temprano y tardío, así como los sustratos de gelatina y fibronectina. Las células se cultivaron en medio Chang C durante 11 días. Se analizó la expresión de ARN y proteínas de proteínas epiteliales/específicas de hepatocitos. La tinción inmunocitoquímica para cytokeratin18, queratina 8, queratina 19, c-met, albúmina, desmina y HNF-1 alfa fue negativa en todas las condiciones. Las células mostraron tinción positiva para vimentina. Se detectó expresión de albúmina y de citocromo p450 2B6 a niveles inferiores a los de las células HepG2 humanas, con cebadores Assay-on-Demand. También se detectaron expresión de albúmina y de citocromo p450 2B6 en las células cultivadas en Medio de crecimiento.

Se trataron células derivadas de la placenta como se describe en el método 1 según un protocolo desarrollado por Schwartz *et al.* (2002) J. Clin. Invertir. 109(10):1391-02). Se detectaron tanto albúmina como citocromo p450 2B6 con los cebadores Assay-on-Demand a niveles inferiores al del control positivo HepG2. No surgió un patrón claro entre las condiciones aplicadas y los niveles de expresión génica, es decir, también se detectó expresión de albúmina y citocromo p450 2B6 en las muestras de control. Se detectó cierta expresión de albúmina y citocromo p450 2B6 con los cebadores ASSAY-ON-DEMAND, sin embargo, los niveles fueron significativamente inferiores a los observados en las células HepG2 humanas.

La oncostatina M a una concentración baja de 1 nanogramo/mililitro aumentaba los niveles de expresión del citocromo p450 2B6 en las células derivadas de la placenta cultivadas en Medio de crecimiento en matraces recubiertos con gelatina. El tratamiento con FGF-4 y HGF tuvo poco efecto y pudo haber reducido la expresión de albúmina y citocromo p450 2B6.

Resumen. Se ensayaron varios protocolos de diferenciación para determinar la capacidad para inducir la diferenciación de las células derivadas de la placenta al fenotipo de hepatocito. Se detectó expresión de marcadores específico de hepatocitos, tales como albúmina y citocromo p450 2B6, lo que indica que las células experimentaron cierta diferenciación a hepatocitos. Las células derivadas de la placenta cultivadas en medio Chang C expresaron citoqueratina 18, un marcador de las células epiteliales en los conductos inferiores o pancreáticos.

EJEMPLO 15

Diferenciación de las células derivadas de la placenta a un fenotipo osteogénico

Se ha demostrado que las células madre mesenquimales (MSC) derivadas de médula ósea se diferencian de manera reproducible a células tipo osteoblasto que mineralizan y expresan fosfatasa alcalina. Se han utilizado marcadores adicionales expresados por los osteoblastos, tales como osteocalcina y sialoproteína ósea, para demostrar la diferenciación a una célula tipo osteoblasto. Se evaluó la capacidad de las células derivadas de la placenta para diferenciarse a un fenotipo osteogénico cultivándolas en un medio osteogénico y añadiendo proteínas morfogénicas óseas (BMP) -2 (Rickard *et al.*, (1994) Dev. Biol. 161:218-228) ó -4, y factor de crecimiento transformante beta 1.

Métodos y materiales

Cultivo celular. Antes del inicio de la osteogénesis, se cultivaron células madre mesenquimales (MSC) en medio Mesenchymal Stem Cell Growth Medium BulletKit (MSCGM, Cambrex, Walkerville, MD). Otras células se cultivaron en Medio de crecimiento (DMEM con bajo contenido de glucosa (Gibco, Carlsbad, CA), suero bovino fetal al 15% (v/v) (SH30070.03; Hyclone, Logan, UT), betamercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma, St. Louis, MO), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomocina (Gibco)), en un matraz T75 recubierto con gelatina y se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS).

Se cultivaron osteoblastos (9F1721; Cambrex) en medio de crecimiento para osteoblastos (Cambrex) y se extrajo el ARN como se describe más adelante.

Osteogénesis

Protocolo 1. Se sembraron células derivadas de la placenta (P3) y (P4) (cariotipadas anteriormente y que demostraron ser predominantemente células de origen neonatal) y MSC (P3), a razón de 5×10^3 células/cm² en placas de 24 pocillos y placas de 6 pocillos en Medio de crecimiento y se incubaron durante la noche. El medio se eliminó y se reemplazó con medio osteogénico (DMEM con bajo contenido de glucosa, suero bovino fetal al 10% (v/v), betaglicerofosfato 10 milimolar (Sigma), dexametasona 100 nanomolar (Sigma, St. Louis, MO), sal de ascorbato fosfato 50 micromolar (Sigma), fungizona (Gibco), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomocina (Gibco)). El medio osteogénico se complementó con 20 nanogramos/mililitro de hTGF-beta1 (Sigma), 40 nanogramos/mililitro de hrBMP-2 (Sigma) ó 40 nanogramos/mililitro de hrBMP-4 (Sigma). Los cultivos se trataron durante un total de 14, 21 y 28 días, con cambios de medios cada 3-4 días.

Protocolo 2. Las células derivadas de la placenta se ensayaron para la capacidad de diferenciarse a un fenotipo osteogénico. Se sembraron células derivadas de la placenta (P4), a 30.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos (recubiertas con gelatina) en Medio de crecimiento. Se sembraron células madre mesenquimales (MSC) (P3 y P4), fibroblastos (P11) y células de médula ósea de cresta ilíaca (P3; publicación internacional PCT n° WO03/025149), a 30.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos (recubiertas con gelatina) en medio Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (MSCGM, Cambrex) y Medio de crecimiento, respectivamente.

Se inició la inducción osteogénica eliminando el medio de siembra inicial (24 h) y sustituyéndolo con medio de inducción osteogénica: DMEM con bajo contenido de glucosa, suero bovino fetal al 10%, betaglicerofosfato 10 milimolar (Sigma), dexametasona 100 nanomolar (Sigma), sal de ascorbato fosfato 50 micromolar (Sigma), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomocina (Gibco). En algunas condiciones, el medio osteogénico se complementó con BMP-2 recombinante humana (hr) (20 nanogramos/mililitro) (Sigma), o hrBMP-4, o tanto con hrBMP-2 (20 nanogramos/mililitro) como con hrBMP-4 (20 nanogramos/mililitro) (Sigma). Los cultivos se trataron durante un total de 28 días, con cambios de medios cada 3-4 días.

Extracción de ARN y transcripción inversa. Las células se lisaron con 350 microlitros de tampón RLT que contenía betamercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO) según las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA) y se almacenaron a -80°C. Los lisados celulares se descongelaron y se extrajo el ARN según las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA) con un tratamiento de 2,7 unidades/muestra

de ADNasa (Sigma St. Louis, MO). El ARN se eluyó con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se almacenó a -80°C. Se sometió el ARN a transcripción inversa utilizando hexámeros aleatorios con los reactivos de transcripción inversa TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA) a 25°C durante 10 minutos, 37°C durante 60 minutos y 95°C durante 10 minutos. Las muestras se almacenaron a -20°C.

5 **PCR.** Se realizó la PCR en muestras de ADNc mediante los productos de expresión génica ASSAYS-ON-DEMAND: sialoproteína ósea (Hs00173720), osteocalcina (Hs00609452), GAPDH (Applied Biosystems, Foster City, CA) y TaqMan Universal PCR Master Mix según las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando un 7000 Sequence Detection System con el software ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las condiciones del termociclador 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.

15 **Tinción de von Kossa.** Las células se fijaron con formalina tamponada neutra al 10% (v/v) (Richard-Allan, Kalamazoo, MI). Después de la fijación, las células se lavaron en agua desionizada y se incubaron en nitrato de plata al 5% (p/v) (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI) durante una hora directamente a la luz del sol. Se lavaron las células en agua desionizada y se incubaron en tiosulfato sódico al 5% (p/v) (EM Sciences, Gibbstown, NJ) durante cinco minutos. A continuación, las células se lavaron en agua destilada y se examinaron con microscopía óptica.

20 **Resultados**

25 *Protocolo 1.* El ARN extraído de los osteoblastos se utilizó como control positivo para la expresión génica en tiempo real de osteocalcina y sialoproteína ósea. Los niveles de expresión de osteocalcina y BSP de los osteoblastos con respecto a las células derivadas de la placenta cultivadas en medio de crecimiento fueron de 2,5 veces y 8.000 veces, respectivamente. Las MSC cultivadas en el medio osteogénico se mineralizaron y fueron positivas para la tinción de von Kossa. La expresión de osteocalcina y BSP de las MSC estaba significativamente aumentada en el medio osteogénico a los 21 días. La adición de BMP-2 y -4 potenció la expresión de BSP pero no tuvo efecto sobre la expresión de osteocalcina. El TGF-beta1 no aumentó el efecto del medio de osteogénesis. Se observó una considerable mineralización con una muestra de placenta (P4) que tenía predominantemente células de origen neonatal. Las células derivadas de la placenta (P3) presentaron inducción de los niveles de expresión de BSP en los medios osteogénicos y bajos niveles de inducción de osteocalcina. BMP-4 y TGF-beta1 aumentaron la expresión de osteocalcina por parte de las células derivadas de la placenta (P3).

35 *Protocolo 2.* Se observó diferenciación osteogénica, como se muestra mediante tinción de von Kossa positiva para la mineralización, con células derivadas de la placenta (P4) e ICBM (P3) incubadas con medio osteogénico complementado con BMP2 ó 4, y MSC (P3) incubadas con medio osteogénico complementado con BMP 4 (**Tabla 15-1**). Ninguna de las demás células se diferenció al fenotipo osteogénico ni se tiñó con von Kossa. Para asegurar que la tinción de von Kossa se relacionaba con la célula y no con la matriz extracelular, se realizó la tinción de contraste de las células con rojo nuclear rápido. Esta tinción demostró grandes gotitas lipídicas en algunas MSC, coherentes con un fenotipo de adipocito. Esto sugiere que las MSC no se diferencian específicamente a un fenotipo osteogénico en estas condiciones. Además, se observó que el nivel de adipogénesis aumentaba cuando las MSC se incubaban en medio osteogénico complementado con BMP2 o con BMP4.

45 **Tabla 15-1:** Resultados de la diferenciación osteogénica con tinción de von Kossa para el Protocolo 2. Se cultivaron células derivadas de la placenta (Pla), células madre mesenquimales (MSC), fibroblastos (Fib) y células de médula ósea de cresta ilíaca (ICBM) en medio osteogénico (OM) solo o complementado con BMP2, o BMP2 y BMP4.

50

55

60

65

Número	Línea celular	Condiciones	von Kossa	Comentarios
1	ICBM P3	Medio osteogénico (OM)	Neg	Normal 02
2	ICBM P3	OM, BMP2	Pos	Normal 03
3	ICBM P3	OM, BMP4	Pos	Normal 04
4	MSC	Medio osteogénico (OM)	Neg	mucha grasa
5	MSC	OM, BMP2	Neg	mucha grasa
6	MSC	OM, BMP4	Pos	mucha grasa
7	Pla P4	Medio osteogénico (OM)	Neg	
8	Pla P4	OM, BMP2	Pos	
9	Pla P4	OM, BMP4	Pos	
10	MSC P4	Medio osteogénico (OM)	Neg	Grasa
11	MSC P4	OM, BMP2	Neg	Grasa
12	MSC P4	OM, BMP2, BMP4	Neg	Grasa
13	Pla P4	Medio osteogénico (OM)	Neg	
14	Pla P4	OM, BMP2	Neg	
15	Pla P4	OM, BMP2, BMP4	Neg	
16	Fib 1F1853 P11	Medio osteogénico (OM)	Neg	
17	Fib 1F1853 P11	OM, BMP2	Neg	
18	Fib 1F1853 P11	OM, BMP2, BMP4	Neg	

Resumen. Se ha demostrado que las MSC derivadas de médula ósea (Kadiyala *et al.*, (1997) Cell Transplant. 6:125-34) así como células derivadas de otros tejidos tales como el adiposo (Halvorsen *et al.*, (2001) Tissue Eng. 7:729-41) se diferencian a células tipo osteoblasto. También se ha demostrado que las MSC se diferencian a adipocitos o a osteoblastos en respuesta a las BMP (Chen *et al.*, (1998) J. Cell Biol. 142:295-305) debido a las diferentes funciones del receptor de proteína morfogenética ósea (BMP) de tipo IB y IA. Las células derivadas de la placenta también son capaces de expresar un fenotipo tipo osteoblasto como se observó anteriormente con las células madre mesenquimales (MSC) derivadas de médula ósea cuando se colocan en un medio osteogénico que contiene dexametasona, B-glicerofosfato y ácido ascórbico. Se llevaron a cabo varios experimentos con diferentes aislados para determinar si había mineralización de las células cultivadas mediante tinción de von Kossa y expresión de sialoproteína ósea (BSP) y osteocalcina, que se expresan en los osteoblastos. Después de inducir la osteogénesis, las MSC demostraron mineralizarse y teñirse con von Kossa y tener también niveles aumentados de ARNm de expresión de sialoproteína ósea y osteocalcina mediante cuantificación relativa en tiempo real. Numerosas MSC también formaron gotitas lipídicas en el citoplasma, como los adipocitos. Las células derivadas de la placenta (predominantemente células neonatales) presentaron una considerable mineralización e inducción de BSP y osteocalcina en el medio osteogénico, que se potenció a los 21 días con BMP-2 o -4

EJEMPLO 16

Diferenciación condrogénica de células derivadas de la placenta

Se ensayaron las células derivadas de la placenta para determinar su capacidad para diferenciarse a condrocitos *in vitro* en dos sistemas de ensayo diferentes: el sistema de cultivo de ensayo de sedimentos y los cultivos con gel de colágeno. El sistema de cultivo de sedimento se ha utilizado con éxito con lotes seleccionados de células madre mesenquimales humanas (MSC). Se ha demostrado que las MSC cultivadas en este ensayo y tratadas con factor de crecimiento transformante beta3 se diferencian a condrocitos (Johnstone, *et al.* (1998) Exp. Cell Res. 238:265-272). El sistema con gel de colágeno se ha utilizado para cultivar condrocitos *in vitro* (Gosiewska, *et al.* (2001) Tissue Eng. 7:267-277). Los condrocitos cultivados en estas condiciones forman una estructura tipo cartílago.

Materiales y métodos

Cultivo celular. Se recibieron placentas humanas y se aislaron las células como se ha descrito (Ejemplo 1). Las células se cultivaron en Medio de crecimiento (medio esencial modificado de Dulbecco (DMEM), suero bovino fetal al 15% (v/v) (Hyclone, Logan UT), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomocina (Invitrogen, Carlsbad, CA), 2-mercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma, St. Louis, MO)) en matraces de plástico de cultivo tisular recubiertos con gelatina. Los cultivos se incubaron a 37°C con CO₂ al 5%. Para su uso en los experimentos, las células se encontraban entre los pases 4 y 12.

Se adquirieron condrocitos articulares humanos de Cambrex (Walkersville, MD) y se cultivaron en los mismos medios que las células derivadas de la placenta. Veinticuatro horas antes del experimento, los medios de cultivo se cambiaron a medios que contenían FBS al 1%.

Se adquirieron células madre mesenquimales humanas (MSC) de Cambrex (Walkersville, MD) y se cultivaron en MSCGM (Cambrex). Las células utilizadas para los experimentos se encontraban entre los pases 2 y 4.

5 **Ensayos con gel de colágeno.** Las células cultivadas se tripsinizaron para extraerlas de la placa de cultivo. Las células se lavaron dos veces con centrifugación a 300 x g durante 5 minutos en DMEM sin suero y se realizó su recuento. Las células se mezclaron con los siguientes componentes a las concentraciones finales indicadas: colágeno de cola de rata (1 miligramo/mililitro, BD DiscoveryLabware, Bedford, MA), NaOH 0,01 Normal y medio condrogénico (DMEM, 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomina, L-glutamina 2 milimolar, piruvato sódico 1 milimolar, L-prolina 0,35 milimolar, dexametasona 100 nanomolar, ácido L-ascórbico 0,17 milimolar, ITS (insulina, transferrina, selenio) al 1% (v/v) (todos los componentes de Sigma Chemical Company)). Las células se mezclaron suavemente con el medio y las muestras se alicuotaron en los pocillos individuales de una placa de adherencia ultra baja (“ultra low cluster plate”) de 24 pocillos (Corning, Corning, NY) a una concentración de 2×10^5 por pocillo o de 5×10^5 por pocillo. Los cultivos se colocaron en una incubadora y se dejaron reposar durante 24 a 48 horas. El medio se reemplazó con medio condrogénico recién preparado complementado con un factor de crecimiento apropiado cada 24-48 horas. Las muestras se dejaron en cultivo durante un máximo de 28 días, momento en el que se extrajeron y fijaron en formalina al 10% (v/v) (VWR Scientific, West Chester, PA) y se procesaron para su examen histológico. Las muestras se tiñeron con safranina O o hematoxilina/eosina para su evaluación.

10 **Ensayos de cultivo de sedimento.** Las células cultivadas se tripsinizaron para extraerlas de la placa de cultivo. Las células se lavaron dos veces con centrifugación a 300 x g durante 5 minutos en DMEM sin suero y se realizó su recuento. Las células se resuspendieron en medio condrogénico recién preparado (descrito anteriormente) a una concentración de 5×10^5 células por mililitro. Las células se alicuotaron en nuevos tubos de polipropileno a razón de $2,5 \times 10^5$ 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, Minneapolis, MN) como factor de crecimiento. A continuación, las células se centrifugaron a 150 x g durante 3 minutos. A continuación, los tubos se transfirieron a la incubadora y se dejaron reposar durante 24 a 48 horas en atmósfera normal con CO₂ al 5% a 37°C. El medio se reemplazó con medio celular para condrocitos recién preparado y factor de crecimiento, cuando procediese, cada 2-3 días. Las muestras se dejaron en cultivo durante un máximo de 28 días, momento en el que se extrajeron y fijaron, y se tiñeron como se ha descrito anteriormente.

30 Resultados

Las tinciones con safranina O de los sedimentos celulares de células derivadas de la placenta tratadas con TGF-beta3 y GDF-5 mostraron tinción positiva para Safranina O, en comparación con las células de control, lo que indica glicosaminoglicano. Las células derivadas de la placenta también mostraron cierta morfología tipo condrocito.

35 **Resumen.** Los resultados del presente estudio demuestran que las células derivadas de la placenta se diferencian parcialmente a condrocitos *in vitro* en los sistemas de ensayo de cultivo de sedimento y de gel de colágeno, como queda demostrado por la expresión de glicosaminoglicano y la similitud de la morfología celular con el tejido cartilaginoso.

40 **EJEMPLO 17**

Evaluación del potencial condrogénico de las células derivadas de la placenta en un ensayo *in vitro* basado en cultivo de sedimento

45 Este ejemplo describe la evaluación del potencial condrogénico de las células derivadas de tejido placentario mediante ensayos *in vitro* basados en cultivo de sedimento. Se utilizaron células derivadas de la placenta en pase temprano (P3) y en pase tardío (P12). El potencial condrogénico de las células se evaluó en ensayos de cultivo de sedimento, en condiciones de inducción condrogénica, en medio complementado con factor de crecimiento transformante beta-3 (TGFbeta-3), rhGDF-5 (factor 5 de crecimiento y diferenciación humano recombinante), o una combinación de ambos.

50 Materiales y métodos

55 **Reactivos.** Se obtuvieron medio esencial modificado de Dulbecco (DMEM), penicilina y estreptomina de Invitrogen, Carlsbad, CA. Se obtuvo suero de ternera fetal (FCS) de Hyclone (Logan, UT). Se obtuvieron medio Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (MSCGM) y medio hMSC Chondrogenic Differentiation BulletKit de Biowhittaker, Walkersville, MD. Se obtuvo TGFbeta-3 de Oncogene Research Products, San Diego, CA. Se obtuvo rhGDF-5 de Biopharm, Heidelberg, Alemania (W09601316 A1, US5994094 A).

60 **Células.** Se obtuvieron células madre mesenquimales humanas (lote nº 2F1656) de Biowhittaker, Walkersville, MD y se cultivaron en MSCGM según las instrucciones del fabricante. Este lote se ha ensayado con anterioridad, y ha demostrado ser 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 (esencial modificado de Dulbecco complementado con suero bovino fetal al 15% (v/v), 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomina y 2-mercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma, St. Louis, MO)) en matraces de plástico de cultivo tisular recubiertos con gelatina. Se utilizaron células

derivadas de la placenta (lote nº 071003Plac). Las células se cultivaron en Medio de crecimiento como los fibroblastos. Los cultivos celulares se incubaron a 37°C con CO₂ al 5%. Las células utilizadas para los experimentos se encontraban en los pases 3 y 12.

5 **Ensayo de cultivo de sedimento.** Para los cultivos de sedimento, se colocaron $0,25 \times 10^6$ 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 realimentaron con medio recién preparado cada dos días. Los grupos de tratamiento fueron los siguientes:

15 Grupo de tratamiento

- 15 A. Pase temprano de células derivadas de la placenta (P EP) + rhGDF-5
 B. Pase tardío de células derivadas de la placenta (P LP) + rhGDF-5
 C. Células madre mesenquimales humanas (HMSC) + rhGDF-5
 D. Fibroblastos adultos humanos (HAF) + rhGDF-5
 20 E. Pase temprano de células derivadas de la placenta (P EP) + TGFbeta-3
 F. Pase tardío de células derivadas de la placenta (P LP) + TGFbeta-3
 G. Células madre mesenquimales humanas (HMSC) + TGFbeta-3
 H. Fibroblastos adultos humanos (HAF) + TGFbeta-3
 25 I. Pase temprano de células derivadas de la placenta (P EP) + rhGDF-5 + TGFbeta-3, n = 1
 J. Pase tardío de células derivadas de la placenta (P LP) + rhGDF-5 + TGFbeta-3
 K. Células madre mesenquimales humanas (HMSC) + rhGDF-5 + TGFbeta-3
 L. Fibroblastos adultos humanos (HAF) + rhGDF-5 + TGFbeta-3
 M. Fibroblastos neonatales humanos (HNF) + rhGDF-5 + TGFbeta-3
 N. Pase temprano de células derivadas de la placenta (P EP)
 30 O. Pase tardío de células derivadas de la placenta (P LP)
 P. Células madre mesenquimales humanas (HMSC)
 Q. Fibroblastos adultos humanos (HAF)

35 **Histología de las muestras *in vitro*.** Al final del periodo de cultivo, los sedimentos se fijaron en formalina tamponada al 10% y se enviaron al MPI Research (Mattawan, MI) para la inclusión en parafina, el corte y la tinción con hematoxilina/eosina (H/E) y Safranina O (SO).

Resultados

40 Las células derivadas de la placenta, las MSC y los fibroblastos formaron sedimentos celulares en el medio de inducción condrogénica con los diferentes factores de crecimiento. El tamaño de los sedimentos al final del período de cultivo variaba entre los diferentes tipos de células. Los sedimentos formados con células placentarias tenían un tamaño similar, o ligeramente superior, al de los formados por las MSC y los 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 condrogénica.

50 El examen de las secciones transversales de los sedimentos teñidos con H/E y Safranina-O proporcionó algún indicio de que las células derivadas de la placenta en pase temprano y tardío pueden tener el potencial de experimentar diferenciación condrogénica. La condrogénesis, evaluada mediante la condensación de células, la morfología celular y la tinción positiva para Safranina O de la matriz era indistinta en las células derivadas de la placenta cultivadas en medio de inducción condrogénica complementado con TGF beta-3, rhGDF-5, o ambos. Sin embargo, esto puede deberse al hecho de que las condiciones de inducción condrogénica se optimizaron para las MSC, no para las células derivadas posparto, y hay que señalar que los sedimentos de control cultivados en medio de crecimiento no dieron muestras de condrogénesis. Además, se observaron distintas poblaciones de células en las células derivadas de la placenta en ambos pases, en situación apical o central. Se observó cierta condensación celular con los fibroblastos, pero no se asoció con la tinción con Safranina O.

EJEMPLO 18

60 Diferenciación adipogénica de las células derivadas de la placenta

65 Se ha demostrado que las poblaciones estromales de células madre se diferencian a 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 examinó el potencial de las células derivadas de la placenta para diferenciarse a un fenotipo adipogénico.

Métodos y materiales

Diferenciación adiposa. Se sembraron células derivadas de la placenta (P3) a razón de 200.000 células por pocillo en placas tratadas para cultivo tisular de 6 pocillos en medio de crecimiento (DMEM: bajo contenido de glucosa (Invitrogen, Carlsbad, CA), suero bovino definido al 15 por ciento (v/v) (Hyclone, Logan, UT; lote nº AND18475), 2-mercaptoetanol al 0,001 por ciento (Sigma, St. Louis, MO), 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomina, 0,25 microgramos por mililitro de anfotericina B; Invitrogen, Carlsbad, CA). También se sembraron células madre mesenquimales (P3, IF2155), osteoblastos (P5, CC2538; Cambrex, Walkerville, MD), células del epiplón (P6) (aisladas de tejido epiloico de NDRI, siguiendo el protocolo utilizado para el aislamiento de células derivadas de la placenta del Ejemplo 1), células derivadas de tejido adiposo (patente de Estados Unidos nº 6.555.374 B1) (P6), y fibroblastos (P6, CC2509) (Cambrex, Walkerville, MD) en las mismas condiciones. Antes de iniciar la osteogénesis, las células madre mesenquimales se cultivaron en un Mesenchymal Stem Cell Growth Medium BulletKit (Cambrex, Walkerville, MD). Después de 2 días, el medio gastado se eliminó por aspiración y las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS). En este momento, el medio se cambió a un medio esencial mínimo de Dulbecco con alto contenido de glucosa (DMEM-Hg; Invitrogen, Carlsbad, CA) que contenía FBS al 10 por ciento (v/v, Hyclone, Logan UT), 0,02 miligramos por mililitro de insulina (Sigma, St. Louis, MO), y 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomina, 0,25 microgramos por mililitro de anfotericina B; Invitrogen, Carlsbad, CA). Una vez las células habían alcanzado la confluencia, el medio gastado se eliminó por aspiración. A continuación, las células se cultivaron en un medio de diferenciación adiposa (DMEM-Hg (Invitrogen, Carlsbad, CA), que contenía suero bovino fetal definido al 10 por ciento ((v/v), Hyclone, Logan, UT), 0,02 miligramos por mililitro de insulina (Sigma, St. Louis, MO) y 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomina y 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina, 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 formación de gotitas lipídicas.

Tinción con Oil Red O. Las células se fijaron con formalina tamponada neutra al 10 por ciento (v/v) (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, Bay Shore, NY) durante una hora. La solución de tinción se eliminó por aspiración y, a continuación, las muestras teñidas se incubaron en solución de propilenglicol al 85 por ciento (v/v) (Poly Scientific, Bay Shore, NY) durante un minuto. Por último, las muestras teñidas se lavaron con dos cambios de agua desionizada. Se realizó la tinción de contraste de las muestras teñidas con hematoxilina de Mayer (Poly Scientific, Bay Shore, NY) y se examinaron con microscopía óptica. Las imágenes se capturaron con una ampliación de 20 X.

Ensayo de leptina. Se sembraron células derivadas de tejido adiposo y células derivadas de la placenta a razón de 200.000 células/pocillo en placas tratadas para cultivo tisular de 6 pocillos. Las células se sembraron inicialmente en medio de crecimiento ((DMEM:Lg; Invitrogen, Carlsbad, CA), FBS al 15% (suero bovino definido lote nº AND18475; Hyclone, Logan, UT), 2-mercaptoetanol al 0,001% (Sigma, St. Louis, MO), 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomina, 0,25 microgramos por mililitro de anfotericina B; Invitrogen, Carlsbad, CA), que se cambió a un medio de diferenciación adipogénica (medio DMEM-Hg (Gibco, Carlsbad, CA) que contenía dexametasona 1 micromolar (Sigma, St. Louis, MO), indometasona 0,2 milimolar (Sigma, St. Louis, MO), 0,01 miligramos por microlitro de insulina (Sigma, St. Louis, MO), isobutilmetilxantina 0,5 milimolar (Sigma, St. Louis, MO), suero bovino fetal al 10 por ciento (v/v) (nº de cat. SH30070.03; Hyclone, Logan, UT), 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomina (Gibco, Carlsbad CA)). Al final del ensayo, se recogió el medio acondicionado y se midieron los niveles de leptina utilizando un kit de ELISA (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN).

Resultados

Diferenciación adiposa. Morfológicamente, las MSC y las células derivadas de tejido adiposo (Artecel; patente de EE.UU. nº 6.555.374) demostraron formar lípidos ya a los 5 días en este ensayo. Se observaron grandes cantidades de formación de gotitas lipídicas en estos dos cultivos a los 15 días del cultivo. Los cultivos de osteoblastos también depositaron grandes cantidades de lípidos en estas condiciones después de 10 días de cultivo y extensamente a los 15 días. Se observó formación de gotitas lipídicas en los cultivos de células derivadas de la placenta y del epiplón después de 15 días de cultivo. Se observó un bajo nivel de formación de gotitas lipídicas en los cultivos de fibroblastos después de 20 días en condiciones adipogénicas.

Leptina. No se detectó leptina mediante ELISA en el medio acondicionado de células derivadas de la placenta.

Resumen. Se examinó el potencial de las células derivadas de la placenta para diferenciarse a un fenotipo adiposo. Los datos demuestran que las células derivadas de la placenta experimentan un bajo nivel de diferenciación adiposa en comparación con los cultivos de células madre mesenquimales, células derivadas de tejido

adiposo u osteoblastos. No se detectó leptina en las células derivadas de la placenta mediante ELISA siguiendo el protocolo de diferenciación adipogénica utilizado.

EJEMPLO 19

5

Diferenciación de las células derivadas de la placenta a células beta

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

Métodos y materiales

15 Se cultivaron células derivadas de la placenta, así como fibroblastos dérmicos humanos normales neonatales o adultos (NHDF) en Medio de crecimiento (DMEM con bajo contenido de glucosa (Gibco, Carlsbad, CA), suero bovino fetal al 15% (v/v) (nº de cat. SH30070.03, Hyclone; Logan, UT), betamercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma, St. Louis, MO), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomina (Gibco, Carlsbad, CA)) en un matraz T75 recubierto con gelatina, así como en diferentes condiciones de diferenciación que promueven las células beta. Los matraces se recubrieron con solución de gelatina al 2% (p/v) (Sigma, St. Louis, MO) durante 20 minutos a temperatura ambiente. La solución de gelatina se eliminó por aspiración, y los matraces se lavaron con PBS. Se adquirieron factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante beta (TGFbeta) y factor de crecimiento de fibroblastos 10 (FGF-10) de PeproTech Inc. (Rocky Hill, NJ). Se adquirió GLP-1 de Sigma (St. Louis, MO)

25 **Protocolo 1:** células derivadas de la placenta (aislado 1; P2), células derivadas de tejido adiposo (patente de EE.UU. nº 6.555.374), células derivadas de la placenta (aislado 2; P4) (predominantemente neonatales mediante análisis del cariotipo - datos no mostrados), y fibroblastos dérmicos humanos normales adultos (NHDF) (P10). Las células se mantuvieron en condiciones normales o en O₂ al 5%. Las células se sembraron a baja densidad (5.000 células/cm²) en matraces T75 recubiertos con gelatina en gelatina y se cultivaron en medio F12 de Ham (Clonetics, Santa Rosa, CA), FBS al 2% (v/v), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomina, 10 nanogramos/mililitro de EGF y 20 nanogramos/mililitro de bFGF hasta la confluencia. Las células confluentes se tripsinizaron y se sembraron a razón de 50.000 células/cm² en placas de poliestireno para cultivo tisular de 24 pocillos (TCPS; BD Biosciences, Bedford, MA) con o sin recubrimiento de gelatina o colágeno. Las células se cultivaron en medio F12 de Ham, FBS al 2%, 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomina, 10 nanogramos/mililitro de EGF, 20 nanogramos/mililitro de bFGF, y GLP-1 15 nanomolar (isoforma 7-37) durante un máximo de 3 semanas.

40 **Protocolo 2:** células derivadas de la placenta (aislado 3; P3) y células derivadas de la placenta (aislado 2; P3) (predominantemente neonatales identificadas mediante análisis del cariotipo). Las células se sembraron a baja densidad (5.000 células/cm²) en matraces T75 en gelatina y se cultivaron en medio F12 de Ham, FBS al 2%, 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomina, 10 nanogramos/mililitro de EGF, 20 nanogramos/mililitro de bFGF hasta la confluencia. Las células confluentes se tripsinizaron y se sembraron a razón de 50.000 células/cm² en placas TCPS de 24 pocillos con o sin recubrimiento de gelatina. Las células se cultivaron en medio F12 de Ham, FBS al 2%, P/S, GLP-1 15 nanomolar (isoforma 7-37) hasta un máximo de 3 semanas.

50 **Protocolo 3:** células derivadas de la placenta (aislado 1; P10), NHDF adultos P10 y células derivadas de la placenta (aislado 2; P3). Las células se sembraron a densidad elevada (50.000 células/cm²) en placas TCPS de 24 pocillos y se cultivaron en medio DMEM:F12 de Ham (1:1), complemento B-27 (Gibco, Carlsbad, CA), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomina, 20 nanogramos/mililitro de EGF, 40 nanogramos/mililitro de bFGF. Se generaron agregados esféricos en un tiempo aproximado de 4-6 días. Después de ese período, se recogieron los agregados esféricos, se centrifugaron, y se volvieron a sembrar en placas de 24 pocillos recubiertas con laminina (BD Biosciences, Bedford, MA), y se cultivaron hasta 3 semanas en medio complementado con B-27 que contenía GLP-1 10 nanomolar (7-37) sin otros factores de crecimiento (es decir, sin bFGF ni EGF).

60 **Protocolo 4:** células derivadas de la placenta (aislado 1; P10), NHDF adultos (P10), células derivadas de la placenta (aislado 2; P3). Las células se sembraron a densidad elevada (50.000 células/cm²) en placas TCPS de 24 pocillos y se cultivaron en medio DMEM:F12 de Ham (1:1), complemento B-27, 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomina, 20 nanogramos/mililitro de EGF, 40 nanogramos/mililitro de bFGF. Se generaron agregados esféricos, por lo general en aproximadamente 4-6 días. Después de ese período, se recogieron los agregados esféricos, se centrifugaron, y se volvieron a sembrar en placas de 24 pocillos recubiertas con laminina y se cultivaron hasta 3 semanas en medio complementado con B-27 que contenía GLP-1 10 nanomolar (isoforma 1-37) pero sin otros factores de crecimiento (es decir, sin bFGF ni EGF).

65

Protocolo 5: *NHDF adultos (P15) y células derivadas de la placenta (aislado 1; P15)*. Las células se sembraron a densidad elevada (50.000 células/cm²) en placas TCPS de 24 pocillos recubiertas con gelatina y se cultivaron en medio DMEM:F12 de Ham (1:1), complemento B-27, 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin, 10 nanogramos/mililitro de FGF-10, y/o 40 nanogramos/mililitro de TGFbeta durante > dos semanas.

Protocolo 6: *NHDF adultos y células derivadas de la placenta (aislado 1; P15)*. Las células se sembraron a densidad elevada (50.000 células/cm²) en placas TCPS de 24 pocillos recubiertas con gelatina y se cultivaron en medio EBM-2, 10 nanogramos/mililitro de FGF-10, y/o 40 nanogramos/mililitro de TGFbeta durante > dos semanas.

Protocolo 7: se sembraron células derivadas de la placenta (aislado 3; P3) a baja densidad (5.000 células/cm²) en matraces T75 en gelatina y se cultivaron en Medio de crecimiento o en medio F12 de Ham, FBS al 2%, 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin, 10 nanogramos/mililitro de EGF, 20 nanogramos/mililitro de bFGF hasta la confluencia. Las células confluentes se tripsinizaron y se sembraron a razón de 50.000 células/cm² en placas TCPS de 24 pocillos, con o sin recubrimiento de gelatina. Se utilizaron tres tipos de medios básicos hasta un máximo de 3 semanas:

medio beta I: medio F12 de Ham, FBS al 2%, nicotinamida 10 milimolar, 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin, glucosa 25 milimolar.

medio beta II: partes iguales de medios DMEM/F12 de Ham, FBS al 2%, nicotinamida 10 milimolar, glucosa 25 milimolar.

medio basal para 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 (isoforma 7-37) 10 nanomolar.

Protocolo 8: *células derivadas de la placenta (aislado 2; P2) (predominantemente neonatales identificadas mediante análisis del cariotipo), células derivadas de la placenta (aislado 2; P1), clon nº 22*. Las células se sembraron a baja densidad (5.000 células/cm²) en matraces TCPS T25 y se cultivaron en DMEM, FBS al 20%, 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin hasta la confluencia.

Aislamiento de ARN total y RT-PCR cuantitativa. Se extrajo el ARN de las células derivadas de la placenta y los fibroblastos cultivados 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 se extrajo el ARN según las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA) con un tratamiento de 2,7 unidades/muestra de ADNasa (Sigma St. Louis, MO). El ARN se eluyó con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se almacenó a -80°C. El ARN se sometió a transcripción inversa utilizando hexámeros aleatorios con los reactivos de transcripción inversa TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA) a 25°C durante 10 minutos, 37°C durante 60 minutos, y 95°C durante 10 minutos. Las muestras se almacenaron a -20°C.

PCR en tiempo real. Se realizó una PCR en muestras de ADNc utilizando los productos de expresión génica ASSAYS-ON-DEMAND: PDX-1 (Hs00426216), proinsulina (Hs00355773), Ngn-3 (Hs00360700), Glut-2 (Hs00165775), GAPDH (Applied Biosystems, Foster City, CA) y TaqMan Universal PCR Master Mix según las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando un 7000 Sequence Detection System con el software ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las condiciones del termociclador 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. Además, se ensayó otro conjunto de cebadores de diseño propio para PDX-1 y Ngn-3. La Tabla 19-1 contiene las secuencias de los cebadores. Se realizó la PCR utilizando estos cebadores como se ha descrito anteriormente. Como control se utilizó ARN total de páncreas (Ambion, Austin, TX). Los datos de la PCR se analizaron según el método $\Delta\Delta C_T$ recomendado por Applied Biosystems (boletín de usuario nº 2 de Applied Biosystems para ABI Prism 7700 Sequence Detection System).

Tabla 19-1: Cebadores

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

Resultados

Para las células derivadas de la placenta tratadas según los protocolos 1-8, no se detectó expresión del marcador específico de páncreas mediante PCR en tiempo real y los cebadores Assay-on-Demand, con la excepción de que se detectaron bajos niveles de Ngn-3 en las células del protocolo 7. Los mismos cebadores produjeron resultados positivos con ADNc derivado de ARN de tejido pancreático. Los resultados de la PCR en tiempo real para PDX-1 y Ngn-3 realizada en muestras de ADNc derivadas de placenta humana se compararon con los resultados para las células derivadas de tejido adiposo cultivadas según el protocolo 1. También se realizó la PCR utilizando cebadores de diseño propio (Tabla 19-1). Los resultados de PCR en tiempo real utilizando estos cebadores para PDX-1 y Ngn-3 realizada en muestras de ADNc derivadas de placenta humana se compararon con los resultados de las células derivadas de tejido adiposo. Los datos obtenidos de la PCR en tiempo real se analizaron mediante el método $\Delta\Delta C_T$ (boletín de usuario nº 2 de Applied Biosystems para ABI Prism 7700 Sequence Detection System) y se expresaron en una escala logarítmica.

Las condiciones experimentales en los protocolos 3 y 8 aplicadas a las células derivadas de la placenta, pero no a los fibroblastos, produjeron estructuras que se asemejan al agrupamiento celular de las células epiteliales pancreáticas en islotes. Estas estructuras surgieron aproximadamente 3-5 días después de la aplicación del protocolo. No se detectó expresión de los marcadores pancreáticos PDX-1, Ngn3, Glut-2 ni proinsulina mediante PCR en tiempo real.

Resumen. Se observó expresión limitada de PDX-1 y Ngn-3 en las células derivadas de la placenta tratadas con diversos protocolos experimentales. No hubo diferencias en los resultados entre los cebadores de diseño propio y los disponibles en el mercado. Por ejemplo, aunque el protocolo número 1 dio datos positivos para PDX-1 y Ngn-3 utilizando los cebadores de diseño propio, los cebadores ASSAYS-ON-DEMAND para los mismos genes produjeron datos negativos. Los resultados no se verificaron directamente mediante técnicas inmunitarias. A pesar de tales diferencias, se ha logrado la expresión de varios marcadores pancreáticos, lo que sugiere el potencial de las células derivadas de la placenta para diferenciarse hacia los fenotipos pancreáticos.

EJEMPLO 20**Diferenciación de las células derivadas de la placenta al fenotipo de cardiomiocito**

Existe una enorme necesidad de un tratamiento que ralentice la evolución y/o cure las cardiopatías, tales como la cardiopatía isquémica y la insuficiencia cardíaca congestiva. Resultan muy deseables células que puedan diferenciarse a cardiomiocitos que puedan integrarse plenamente en el músculo cardíaco del paciente sin arritmias. Se ha demostrado que las células madre mesenquimales de roedores tratadas con 5-azacitidina expresan marcadores de cardiomiocitos (Fukuda *et al.* (2002) C. R. Biol. 325:1027-38). Esto no se ha demostrado para las células madre humanas adultas. Se han utilizado factores adicionales para mejorar la diferenciación de las células madre, incluidos bajos niveles de 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 internacional PCT nº WO03/025149), que efectúa la translocación de PKC desde el citosol a la membrana plasmática y es un inhibidor de la actividad de PKC. En este ejemplo, se trataron células derivadas de la placenta con 5-azacitidina, sola o en combinación con DMSO o cloruro de queleritrina y marcadores de cardiomiocito medido mediante PCR en tiempo real.

Métodos y materiales

Células. Se cultivaron células derivadas de la placenta crioconservadas (P24) en Medio de crecimiento (DMEM con bajo contenido de glucosa (Gibco, Carlsbad CA), suero bovino fetal al 15% (v/v) (nº de cat. SH30070.03, Hyclone, Logan UT), betamercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma, St. Louis, MO), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomina (Gibco)), en un matraz recubierto con gelatina. Las células se sembraron a razón de 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 uM, 3 uM, 10 uM y 30 uM (Sigma, St. Louis, MO) sola o con cloruro de queleritrina 5 micromolar (Sigma), sulfóxido de dimetilo al 1% (v/v) (DMSO) (Sigma) o ácido retinoico 1 micromolar (Sigma) en MEM-alfa (Sigma), insulina, transferrina y selenio (ITS; Sigma), suero bovino fetal al 10% (v/v), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomina, y se incubaron las células a 37°C, O₂ al 5% (v/v) durante 48 ó 72 horas. A continuación, se cambió el medio a MEM-alfa, insulina, transferrina y selenio, suero bovino fetal al 10% (v/v), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomina, y se incubaron las células a 37°C, O₂ al 5% (v/v) durante 14 días.

Extracción de ARN y transcripción inversa. Las células se lisaron con 150 microlitros de tampón RLT que contenía betamercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO) según las instrucciones del fabricante (RNeasy 96 Kit, Qiagen, Valencia, CA) y se almacenaron a -80°C. Los lisados celulares se descongelaron y se extrajo el ARN según las instrucciones del fabricante (RNeasy 96 Kit, Qiagen, Valencia, CA) con un tratamiento de 2,7 unidades/muestra de ADNasa (Sigma St. Louis, MO). El ARN se eluyó con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se almacenó a -80°C. Se sometió el ARN a transcripción inversa utilizando hexámeros aleatorios con los reactivos de transcripción

inversa TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA) a 25°C durante 10 minutos, 37°C durante 60 minutos y 95°C durante 10 minutos. Las muestras se almacenaron a -20°C.

5 **PCR.** Se realizó la PCR en muestras de ADNc mediante los productos de expresión génica ASSAYS-ON-DEMAND: miosina cardíaca (Hs00165276 ml), miosina esquelética (Hs00428600), GATA 4 (Hs00171403 ml), GAPDH (Applied Biosystems, Foster City, CA) y TaqMan Universal PCR Master Mix según las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando un 7000 Sequence Detection System con el software ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las condiciones del termociclador 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. Como control se utilizaron ADNc de corazón y de músculo esquelético (Ambion Austin TX).

Resultados

15 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 expresión de GATA 4. Las células derivadas de la placenta (P24) tratadas durante 72 horas con factores y cultivadas durante otros 14 días expresaron GATA 4, pero no miosina esquelética ni miosina cardíaca. Las muestras adicionales de la placenta que se analizaron mostraron expresión de GATA 4.

20 **Resumen.** Las células derivadas de la placenta no tratadas expresan constitutivamente GATA 4, un factor de transcripción nuclear de los cardiomiocitos, las células de Sertoli, y los hepatocitos.

EJEMPLO 21

Tratamiento de células derivadas de la placenta con progesterona y AMPc

30 La placenta comprende células tanto maternas como neonatales. Las células maternas se derivan de la pared uterina durante el proceso de implantación. Las células del endometrio del útero experimentan un proceso llamado decidualización después de la concepción que es activado por hormonas esteroideas y señales embrionarias que cambian la morfología, el fenotipo y la función de las células. La morfología de las células cambia de fibroblástica a poligonal. Se reduce la expresión de alfa-actina de músculo liso, y las células comienzan a expresar desmina, prolactina y proteína de unión al factor de crecimiento insulinoide 1 (IGFBP-1) (Fazleabas y Strakova (2002) Mol. Cellular. Endo. 186:143-147). En el presente estudio se investigaron los efectos de la progesterona y el 8-bromoadenosina-3',5'-monofosfato cíclico, un análogo del AMPc. Se ha demostrado anteriormente que estos compuestos promueven la decidualización del endometrio *in vitro* (Gellersen y Brosens (2003) J. Endocrinol. 178:357-372). Se trataron fibroblastos, células madre mesenquimales (MSC) y células derivadas de la placenta con progesterona y un análogo de AMPc durante 3 y 6 días, y se tiñeron para desmina, un marcador de decidualización, y vimentina para las células mesenquimales del estroma.

Métodos y materiales

40 Se sembraron células madre mesenquimales (P3) (Cambrex, Walkersville, MD), células derivadas de la placenta (P3) (cariotipo materno) y fibroblastos dérmicos (P10) (Cambrex,) en portaobjetos de cámara LabTek II recubiertos con gelatina (Nalgene, Rochester, NY) a razón de 10.000 células/pocillo en Medio de crecimiento (DMEM con bajo contenido de glucosa (Gibco Carlsbad CA), suero bovino fetal al 15% (v/v) (Hyclone, Logan, UT), betamercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma, St. Louis, MO), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomina (Gibco)). Las células se hicieron confluentes en 4 días y el medio se cambió a 1) medio basal de control (DMEM con bajo contenido de glucosa (Gibco), suero bovino fetal al 10% (v/v) tratado con carbón vegetal/dextrano (Hyclone), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomina (Gibco), Fungizone (Gibco) ó 2) medio basal que contenía progesterona 63,5 micromolar (Sigma) y 8-bromoadenosina-3',5'-monofosfato cíclico 0,76 milimolar (Sigma). Las células se incubaron durante 3 ó 6 días, cambiándose los medios a los 3 días. Las células se lavaron con PBS (Gibco) y se fijaron con paraformaldehído al 4% (p/v) (Sigma) durante 20 minutos y se almacenaron a 4°C en solución salina tamponada con fosfato.

55 Se realizó la inmunocitoquímica para evaluar la expresión de vimentina (1:500, Sigma,) y desmina (1:150, Sigma). En resumen, los cultivos fijados se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una solución de bloqueo de proteínas que contenía PBS, suero de cabra al 4% (Chemicon, Temecula, CA) y Triton al 0,3% (Triton X-100, Sigma) durante 30 minutos. A continuación, se aplicaron las soluciones de anticuerpo primario a las muestras que contenían solución de bloqueo más anticuerpo contra vimentina (1:500) y desmina (1:150) durante un período de 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se eliminaron las soluciones de anticuerpo primario y las muestras se lavaron con PBS antes de aplicar las soluciones de anticuerpo secundario (1 hora a temperatura ambiente) que contenían solución de bloqueo junto con IgG de cabra contra ratón - Texas Red (1:250) e IgG de cabra contra conejo - Alexa 488 (1:250; Molecular Probes, Eugene, OR). Las muestras se lavaron y se aplicó DAPI 10 micromolar (Molecular Probes) durante 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.

65

Después de la inmunotinción, se visualizó la fluorescencia mediante un filtro de fluorescencia apropiado en un microscopio de epifluorescencia invertido Olympus. Se capturaron imágenes representativas con una cámara de video digital en color y el software ImagePro (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para las muestras con triple tinción, cada imagen se tomó utilizando solamente un filtro de emisión a la vez. A continuación, se prepararon montajes en capas utilizando el software Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA).

Resultados

Ninguna de las células, a excepción de las MSC, en el medio de control mostró tinción para vimentina o desmina el día 3 ó 6. Las células derivadas de la placenta maternas los días 3 y 6 mostraron un cambio en la morfología cuando se trataron con progesterona y 8-bromoadenosina-3',5'-monofosfato cíclico. Las células derivadas de la placenta se hicieron de fase brillante y tuvieron una tasa de proliferación significativamente reducida, lo que dio como resultado un cultivo de menor densidad. Las células derivadas de la placenta fueron las únicas células que se tiñeron intensamente para vimentina cuando se trataron con progesterona y 8-bromoadenosina-3',5'-monofosfato cíclico durante 3 ó 6 días. Las MSC mostraron tinción débilmente positiva para vimentina en ambas condiciones los días 3 y 6.

Resumen. Las células derivadas de la placenta y los fibroblastos cultivados en DMEM con bajo contenido de glucosa con suero bovino fetal 10% expresan normalmente vimentina. En el presente análisis, no hubo tinción para vimentina cuando las células se cultivaron en suero de ternera fetal al 10% tratado con carbón vegetal/dextrano durante tan solo 3 días. Las células derivadas de la placenta maternas mostraron un cambio en la morfología y expresión de vimentina con el tratamiento de progesterona y 8-bromoadenosina-3',5'-monofosfato cíclico. No se detectó expresión de desmina.

El análisis de matriz génica reveló que hay poca o nula expresión del receptor de progesterona en las células ensayadas. Se detectó expresión de un supuesto receptor de esteroides, componentes 1 y 2 de la membrana para progesterona (907-11 Gerdes *et al.* (1998) Biol Chem.379.).

EJEMPLO 22

Diferenciación neural a corto plazo de las células derivadas de la placenta

Se examinó la capacidad de las células derivadas de la placenta para diferenciarse a células de linaje neural.

Materiales y métodos

Aislamiento y expansión de las células derivadas de la placenta. Se aislaron y expandieron células derivadas de la placenta tal como se describe en el Ejemplo 1.

Protocolo de Woodbury-Black modificado. (A) Este ensayo es una adaptación de un ensayo realizado originalmente para ensayar el potencial de inducción neural de las células del estroma de médula ósea (1). Se descongelaron y expandieron células derivadas de la placenta (P3) en Medio de crecimiento a razón de 5.000 células/cm² hasta alcanzar la subconfluencia (75%). A continuación, las células se tripsinizaron y se sembraron a razón de 6.000 células por pocillo de un portaobjetos de vidrio Titretek II (VWR International, Bristol, CT). Como controles, también se sembraron células madre mesenquimales (P3; 1F2155; Cambrex, Walkersville, MD), osteoblastos (P5; CC2538; Cambrex), células del epiplón (P6; (041003)), células Artecél (US6555374 B1) (P6; donante 2) y fibroblastos dérmicos humanos neonatales (P6; CC2509; Cambrex) en las mismas condiciones.

Todas las células se expandieron inicialmente durante 4 días en medio DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contenía suero bovino fetal al 15% (v/v) (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) y 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomina (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 + FBS al 20% (v/v) + 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomina durante 24 horas. Después de 24 horas, las células se aclararon con PBS. A continuación, las células se cultivaron durante 1 a 6 horas en un medio de inducción que estaba compuesto por DMEM/F12 (sin suero) que contenía hidroxianisol butilado 200 milimolar, cloruro potásico 10 nanomolar, 5 miligramos/mililitro de insulina, forskolina 10 nanomolar, ácido valproico 4 nanomolar e hidrocortisona 2 nanomolar (todos los productos químicos de Sigma, St. Louis, MO). A continuación, se fijaron las células en metanol al 100% a -20°C y se realizó la inmunocitoquímica (véanse los métodos que se presentan más adelante) para evaluar la expresión de la proteína nestina humana.

(B) Se descongelaron y expandieron en cultivo células derivadas de la placenta (P11) y fibroblastos dérmicos humanos adultos (1F1853, P11) en Medio de crecimiento a razón de 5.000 células/cm² hasta alcanzar la subconfluencia (75%). A continuación, las células se tripsinizaron y se sembraron a una densidad similar a la de (A),

pero en (1) placas tratadas para cultivo tisular de 24 pocillos (TCP, marca Falcon, VWR International), (2) pocillos TCP + gelatina al 2% (p/v) adsorbida durante 1 hora a temperatura ambiente, o (3) pocillos TCP + 20 nanogramos/mililitro de laminina de ratón adsorbida (adsorbida durante un mínimo de 2 horas a 37°C; Invitrogen).

5 Exactamente como en (A), se expandieron inicialmente las células y se cambiaron los medios en los plazos de tiempo anteriormente mencionados. Se fijó un conjunto de cultivos, como anteriormente, a los 5 días y seis horas, esta vez con paraformaldehído al 4% (p/v) a 4°C (Sigma) durante 10 minutos a temperatura ambiente. En el segundo conjunto de cultivos, se eliminó el medio y se cambió a medio de expansión de progenitoras neurales (NPE) que consistía en medio Neurobasal-A (Invitrogen) que contenía B27 (complemento B27; Invitrogen), L-glutamina (4 milimolar) y 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin (Invitrogen). El medio NPE se complementó adicionalmente con ácido retinoico (RA; 1 micromolar; Sigma). Este medio se eliminó 4 días más tarde y los cultivos se fijaron con paraformaldehído al 4% (p/v) a 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 22-1).

15 **Tabla 22-1 Resumen de anticuerpos primarios utilizados**

Anticuerpo	Concentración	Proveedor
Rata 401 (nestina)	1:200	Chemicon, Temecula, CA
Nestina humana	1:100	Chemicon
TuJ1 (BIII tubulina)	1:500	Sigma, St. Louis, MO
GFAP	1:2.000	DakoCytomation, Carpinteria, CA
Tirosina hidroxilasa (TH)	1:1.000	Chemicon
GABA	1:400	Chemicon
Desmina (ratón)	1:300	Chemicon
Alfa actina de músculo liso	1:400	Sigma
Proteína nuclear humana (hNuc)	1:150	Chemicon

30 **Protocolo de diferenciación de dos etapas.** Se descongelaron y expandieron en cultivo células derivadas de la placenta (P11), fibroblastos dérmicos humanos adultos (P11; 1F1853; Cambrex) en Medio de crecimiento a razón de 5.000 células/cm² hasta alcanzar la subconfluencia (75%). A continuación, las células se tripsinizaron y se sembraron a razón de 2.000 células/cm², pero en placas de 24 pocillos recubiertas con laminina (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) en presencia de medio NPE complementado con bFGF (20 nanogramos/mililitro; Peprotech, Rocky Hill, NJ) y EGF (20 nanogramos/mililitro; Peprotech) [toda la composición de medios se denomina en adelante NPE + F + E]. Al mismo tiempo, también se sembraron progenitoras neurales adultas de rata aisladas del hipocampo (P4; 062603; véase el Ejemplo 23) en placas de 24 pocillos recubiertas con laminina en medio NPE + F + E. Todos los cultivos se mantuvieron en tales condiciones durante un período de 6 días (las células se alimentaron una vez durante ese tiempo) momento en el que se cambió el medio a las condiciones de diferenciación enumeradas en la Tabla 22-2 durante un período adicional de 7 días. Los cultivos se fijaron con paraformaldehído al 4% (p/v) enfriado en hielo (Sigma) durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se tiñeron para la expresión de las proteínas nestina humana o de rata, GFAP y TuJ1.

45 **Tabla 22-2. Resumen de las condiciones para el protocolo de diferenciación de dos etapas**

Nº de COND.	PREDIFERENCIACIÓN	DIF. 2ª ETAPA
1	NPE + F + E	NPE + SHH (200 nanogramos/mililitro) + F8 (100 nanogramos/mililitro)
2	NPE + F + E	NPE + SHH (200 nanogramos/mililitro) + F8 (100 nanogramos/mililitro) + RA (1 micromolar)
3	NPE + F + E	NPE + RA (1 micromolar)
4	NPE + F + E	NPE + F (20 nanogramos/mililitro) + E (20 nanogramos/mililitro)
5	NPE + F + E	Medio de crecimiento
6	NPE + F + E	Condición 1B + rhGDF-5 (20 nanogramos/mililitro)
7	NPE + F + E	Condición 1B + BMP7 (20 nanogramos/mililitro)
8	NPE + F + E	Condición 1B + GDNF (20 nanogramos/mililitro)
9	NPE + F + E	Condición 2B + rhGDF-5 (20 nanogramos/mililitro)
10	NPE + F + E	Condición 2B + BMP7 (20 nanogramos/mililitro)
11	NPE + F + E	Condición 2B + GDNF (20 nanogramos/mililitro)
12	NPE + F + E	Condición 3B + rhGDF-5 (20 nanogramos/mililitro)
13	NPE + F + E	Condición 3B + BMP7 (20 nanogramos/mililitro)
14	NPE + F + E	Condición 3B + GDNF (20 nanogramos/mililitro)
15	NPE + F + E	NPE + rhGDF-5 (20 nanogramos/mililitro)
16	NPE + F + E	NPE + BMP7 (20 nanogramos/mililitro)
17	NPE + F + E	NPE + GDNF (20 nanogramos/mililitro)

Protocolo de cocultivo de progenitoras neurales. Se sembraron progenitoras de hipocampo de rata adulta (062603) como neuroesferas o células individuales (10.000 células/pocillo) en placas de 24 pocillos recubiertas con laminina (BD Biosciences) en NPE + F (20 nanogramos/mililitro) + E (20 nanogramos/mililitro).

Por separado, se descongelaron y expandieron en cultivo células derivadas de la placenta (022803) P11 en NPE + F (20 nanogramos/mililitro) + E (20 nanogramos/mililitro) a razón de 5.000 células/cm² durante un periodo de 48 horas. A continuación, las células se tripsinizaron y se sembraron a razón de 2.500 células/pocillo en cultivos existentes de progenitoras neurales. En ese momento, el medio existente se cambió por medio recién preparado. Cuatro días más tarde, los cultivos se fijaron con paraformaldehído al 4% (p/v) enfriado en hielo (Sigma) durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se tiñeron para la proteína nuclear humana (hNuc; Chemicon) (Tabla 22-1 anterior) para identificar las PPDC.

Inmunocitoquímica. Se realizó la inmunocitoquímica utilizando los anticuerpos enumerados en la Tabla 22-1. Los cultivos se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una solución de bloqueo de proteínas que contenía PBS, suero de cabra al 4% (v/v) (Chemicon, Temecula, CA), y Triton al 0,3% (v/v) (Triton X-100; Sigma) durante 30 minutos para acceder a los antígenos intracelulares. A continuación, se aplicaron a los cultivos los anticuerpos primarios, diluidos en solución de bloqueo, durante un periodo de 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se eliminaron las soluciones de anticuerpo primario y los cultivos se lavaron con PBS antes de aplicar las soluciones de anticuerpo secundario (1 hora a temperatura ambiente) que contenían solución de bloqueo junto con IgG de cabra contra ratón - Texas Red (1:250; Molecular Probes, Eugene, OR) e IgG de cabra contra conejo - Alexa 488 (1:250; Molecular Probes). A continuación, se lavaron los cultivos y se aplicó DAPI 10 micromolar (Molecular Probes) durante 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.

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

Resultados

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 alargados. También se observaron otras morfologías no bipolares más grandes. Además, las poblaciones de células inducidas mostraron tinción positiva para nestina, un marcador de células madre y progenitoras neurales multipotentes.

(B) Cuando se repitió en placas de plástico para cultivo tisular (TCP), no se observó expresión de nestina a menos que hubiese laminina preadsorbida en la superficie de cultivo. Para evaluar adicionalmente si las células que expresaban nestina podrían pasar a generar neuronas maduras, se expusieron PPDC y fibroblastos a NPE + RA (ImicroMolar), una composición de medios que se sabe induce la diferenciación de las células madre y progenitoras neurales a tales células (2,3,4). Las células se tiñeron para TuJ1, un marcador de neuronas maduras e inmaduras, GFAP, un marcador de astrocitos, y nestina, un marcador de progenitoras neurales. En ninguna de las condiciones se activó la expresión de TuJ1 ni se observaron células con morfología neuronal, lo que sugiere que no se generaron neuronas a corto plazo. Además, las PDC ya no expresaban nestina ni GFAP, como se determinó mediante inmunocitoquímica.

Resultados de la diferenciación en dos etapas. Se sembraron células derivadas de la placenta (así como fibroblastos humanos y progenitoras neurales de roedor como tipos celulares de control negativo y positivo, respectivamente) en placas recubiertas con laminina (de estimulación neural) y se expusieron a 13 condiciones diferentes de crecimiento (y dos condiciones de control) que se sabe estimulan la diferenciación de las progenitoras neurales a neuronas y astrocitos. Además, se añadieron dos condiciones para examinar la influencia de GDF5 y BMP7 en la diferenciación de las PPDC. En general, se adoptó un enfoque de diferenciación de dos etapas, en el que las células se colocaron primero en condiciones de expansión de progenitoras neurales durante un periodo de 6 días, seguido de condiciones de diferenciación completa durante 7 días. Morfológicamente, las células derivadas de la placenta presentaron cambios fundamentales en la morfología celular durante el transcurso de este procedimiento. Sin embargo, en ningún caso se observaron células neuronales o en forma de astrocitos, a excepción del control, en condiciones de siembra de progenitoras neurales. La inmunocitoquímica, negativa para nestina humana, TuJ1 y GFAP confirmó estas observaciones morfológicas.

Procedimientos de cocultivo de progenitoras neurales y PDC. Se sembraron células derivadas de la placenta sobre cultivos de progenitoras neurales de rata sembradas dos días antes en condiciones de expansión neural (NPE + F + E). Aunque la confirmación visual de las células derivadas de la placenta sembradas 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 de la exposición de 6 días) mostró que tendían a apolotonarse y evitar el contacto con las progenitoras neurales. Además, allí donde se fijaban las células placentarias, estas células se dispersaban y parecían estar invadidas por neuronas diferenciadas que eran procedentes de rata, lo que sugiere que las células placentarias pueden haberse diferenciado a células musculares. Esta observación se basó en la morfología al microscopio de contraste de fase. Otra observación fue que los cuerpos celulares por lo general grandes (mayores que las progenitoras neurales) poseían morfologías que se parecían a las progenitoras neurales, con procesos delgados que se extendían en múltiples direcciones. La tinción de hNuc (que se encontró en la mitad del núcleo de la célula) sugirió que en algunos casos estas células humanas pueden haberse fusionado con las progenitoras de rata y adoptado su fenotipo. Los pocillos de control que contenían las progenitoras neurales sólo tenían un menor número de progenitoras totales y células diferenciadas evidentes que los pocillos de cocultivo que contenían las células placentarias, lo que indica además que las células derivadas de la placenta influían en la diferenciación y el comportamiento de las progenitoras neurales, bien mediante la liberación de citocinas y quimiocinas, o mediante efectos mediados por el contacto.

Resumen. Se llevaron a cabo protocolos múltiples para determinar el potencial a corto plazo de las PPDC derivadas de la placenta para diferenciarse a células del linaje neural. Estos incluían imágenes de contraste de fase de la morfología en combinación con inmunocitoquímica para nestina, TuJ1 y GFAP, proteínas asociadas con las células progenitoras y madre neurales multipotentes, neuronas maduras e inmaduras, y astrocitos, respectivamente. Se observaron indicios que sugieren que se produjo diferenciación neural en determinados casos en esos protocolos a corto plazo.

Se hicieron varias observaciones notables en cocultivos de PPDC con progenitoras neurales. Este enfoque, utilizando PPDC humanas junto con un tipo de célula xenogénica permitió la determinación irrefutable del origen de cada célula en estos cultivos. En primer lugar, se observaron algunas células en estos cultivos en las que el citoplasma celular estaba agrandado, con procesos tipo axón que se prolongaban alejándose del cuerpo de la célula, estando sin embargo solamente la mitad del cuerpo marcado con la proteína hNuc. Esas células pueden ser PPDC humanas que se han diferenciado a células de linaje neural o pueden ser PPDC que se han fusionado con progenitoras neurales procedente de rata. En segundo lugar, parece que las progenitoras neurales prolongaban los axones hasta las PPDC de una manera que indica que las progenitoras se diferenciaban a neuronas e invadían las PPDC. En tercer lugar, los cultivos de progenitoras neurales y PPDC tenían más células procedente de rata y mayor cantidad de diferenciación que los cultivos de control de progenitoras neurales solas, lo que indica además que las PPDC sembradas proporcionan factores solubles y/o mecanismos dependientes del contacto que estimulan la supervivencia, proliferación y/o diferenciación de las progenitoras neurales.

Referencias para el Ejemplo 22

- (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 23

Factores tróficos celulares derivados de la placenta para sustentar a las progenitoras neurales

Se examinó la influencia de las células derivadas de la placenta sobre la supervivencia y diferenciación de las células progenitoras y madre neurales adultas a través de mecanismos no dependientes de contacto (tróficos).

Materiales y métodos

Aislamiento de células progenitoras y madre neurales adultas. Se sacrificaron por asfixia con CO₂ ratas adultas Fisher 344, seguido de dislocación cervical. Se extrajeron los cerebros completos intactos utilizando gubias óseas y se diseccionó tejido del hipocampo en base a incisiones coronales posteriores a las regiones motora y somatosensorial del cerebro (1). El tejido se lavó en medio Neurobasal-A (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contenía B27 (complemento B27; Invitrogen), L-glutamina (4 milimolar; Invitrogen) y 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin (Invitrogen), la combinación de los cuales se denomina en el presente documento medio de expansión de progenitoras neurales (NPE). El medio NPE se complementó adicionalmente con bFGF (20 nanogramos/mililitro, Peprotech, Rocky Hill, NJ) y EGF (20 nanogramos/mililitro, Peprotech, Rocky Hill, NJ), denominado en el presente documento NPE + bFGF + EGF.

Después del lavado, se extrajeron las meninges suprayacentes, y se picó el tejido con un bisturí. Se recogió el tejido picado y se añadió tripsina/EDTA (Invitrogen) como el 75% del volumen total. También se añadió ADNasa (100 microlitros por 8 mililitros de volumen total, Sigma, St. Louis, MO). A continuación, se hizo pasar el tejido/medios secuencialmente a través de una aguja de calibre 18, una aguja de calibre 20, y por último, 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 recién preparado y se resuspendió el sedimento. La suspensión celular resultante se hizo pasar a través de un filtro celular de 40 micrómetros (BD Biosciences), se sembró en matraces T-75 recubiertos con laminina (Becton Dickinson) o placas de baja adherencia de 24 pocillos (Becton Dickinson), y se cultivaron en medio NPE + bFGF + EGF hasta que se

Siembra de células derivadas de la placenta. Se sembraron células derivadas de la placenta (P12) previamente cultivadas en Medio de crecimiento, a razón de 5.000 células/inserto Transwell (dimensionado para placa de 24 pocillos) y se cultivaron durante un período de una semana en Medio de crecimiento en los insertos para alcanzar la confluencia.

Siembra de progenitoras neurales adultas. Se sembraron progenitoras neurales, cultivadas como neuroesferas o como células individuales, en placas de 24 pocillos recubiertas con laminina a una densidad aproximada de 2.000 células/pocillo en NPE + bFGF + EGF durante un período de un día para promover la fijación celular. Un día más tarde, se añadieron insertos Transwell que contenían células derivadas de la placenta según el siguiente esquema:

(1) Transwell (placenta en Medio de crecimiento, 200 microlitros) + progenitoras neurales (NPE + bFGF + EGF, 1 mililitro).

(2) Transwell (fibroblastos dérmicos humanos adultos [1F1853; Cambrex, Walkersville, MD] P12 en Medio de crecimiento, 200 microlitros) + progenitoras neurales (NPE + bFGF + EGF, 1 mililitro).

(3) Control: progenitoras neurales solas (NPE + bFGF + EGF, 1 mililitro).

(4) Control: progenitoras neurales solas (solamente NPE, 1 mililitro).

Inmunocitoquímica. Después de 7 días en cocultivo, todas las condiciones se fijaron con paraformaldehído frío al 4% (p/v) (Sigma) durante un periodo de 10 minutos a temperatura ambiente. La inmunocitoquímica se realizó utilizando anticuerpos dirigidos contra los epítomos enumerados en la Tabla 23-1. En resumen, los cultivos se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una solución de bloqueo de proteínas que contenía PBS, suero de cabra al 4% (v/v) (Chemicon, Temecula, CA) y Triton al 0,3% (v/v) (Triton X-100; Sigma) durante 30 minutos para acceder a los antígenos intracelulares. A continuación, se eliminaron las soluciones de anticuerpo primario y los cultivos se lavaron con PBS antes de aplicar las soluciones de anticuerpo secundario (1 hora a temperatura ambiente) que contenían solución de bloqueo junto con IgG de cabra contra ratón - Texas Red (1:250; Molecular Probes, Eugene, OR) e IgG de cabra contra conejo - Alexa 488 (1:250; Molecular Probes). A continuación, se lavaron los cultivos y se aplicó DAPI 10 micromolar (Molecular Probes) durante 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.

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

Tabla 23-1. Resumen de los anticuerpos primarios utilizados

Anticuerpo	Concentración	Proveedor
Rata 401 (nestina)	1:200	Chemicon, Temecula, CA
TuJ1 (BIII tubulina)	1:500	Sigma, St. Louis, MO
Tirosina hidroxilasa (TH)	1:1.000	Chemicon
GABA	1:400	Chemicon
GFAP	1:2.000	DakoCytomation, Carpinteria, CA
Proteína básica de mielina (MBP)	1:400	Chemicon

Análisis cuantitativo de la diferenciación de progenitoras neurales. Se examinó la cuantificación de la diferenciación de las progenitoras neurales del hipocampo. Se contó un mínimo de 1.000 células por condición o, si era menor, el número total de células observadas en esa condición. El porcentaje de células positivas para una determinada tinción se evaluó dividiendo el número de células positivas por el número total de células, determinado mediante tinción DAPI (nuclear).

Análisis de espectrometría de masas y electroforesis en gel 2D. Con el fin de identificar los factores secretados únicos como resultado del cocultivo, se congelaron a -80°C, durante la noche, muestras de medios acondicionados tomadas antes de la fijación del cultivo. A continuación, se aplicaron las muestras a dispositivos de ultrafiltración centrífuga (peso molecular límite 30 kD). El material retenido se aplicó a cromatografía de inmunoafinidad (contra albúmina humana; IgY) (la inmunoafinidad no eliminó la albúmina de las muestras). El filtrado

se analizó mediante MALDI. La fracción que atraviesa el filtro se aplicó a cromatografía de afinidad Cibachron Blue. Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE y electroforesis en gel 2D.

Resultados

5 **El cocultivo de células derivadas de la placenta estimula la diferenciación de las progenitoras neurales adultas.** Después del cultivo con células derivadas de la placenta, las células progenitoras neurales cocultivadas derivadas de hipocampo de ratas adultas presentaron diferenciación a lo largo de los tres linajes principales del sistema nervioso central. Este efecto se observó claramente después de cinco días de cocultivo, habiendo numerosas células elaborando procesos complejos y perdiendo sus cualidades de fase brillante características de las células progenitoras en división. Por el contrario, las progenitoras neurales cultivadas en solitario en ausencia de bFGF y EGF parecían poco saludables y su supervivencia fue limitada.

15 Una vez finalizado el procedimiento, los cultivos se tiñeron para los marcadores indicativos de células progenitoras y madre indiferenciadas (nestina), neuronas maduras e inmaduras (TuJ1), astrocitos (GFAP) y oligodendrocitos maduros (MBP). La diferenciación a lo largo de los tres linajes se confirmó mientras las condiciones de control no mostrasen una diferenciación significativa como queda demostrado por la retención de la tinción positiva para nestina entre la mayoría de las células. Aunque la diferenciación también parecía estar influida por los fibroblastos humanos adultos, tales células no fueron capaces de estimular la diferenciación de los oligodendrocitos maduros ni fueron capaces de generar una cantidad apreciable de neuronas. Aunque no se ha cuantificado, los fibroblastos, sin embargo, parecían mejorar la supervivencia de las progenitoras neurales y su descendencia, de manera similar a los hallazgos para las células posparto derivadas de la placenta.

20 **Identificación de compuestos únicos.** Se examinaron los medios acondicionados de las condiciones de ensayo de placenta, junto con los controles apropiados (medio NPE \pm 1,7% de suero, medios del cocultivo con fibroblastos) para determinar las diferencias. Se identificaron compuestos potencialmente únicos y se cortaron de sus respectivos geles 2D.

25 **Resumen.** El cocultivo de células progenitoras neurales adultas con células posparto derivadas de la placenta da como resultado la diferenciación de esas células. En vista de la ausencia de contacto entre las PPDC y las progenitoras neurales, este resultado parece estar en función de factores solubles liberados de las PPDC (efecto trófico).

30 Se hicieron otras varias observaciones. En primer lugar, había 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, había aproximadamente 100 células o menos por pocillo. En segundo lugar, es de esperar que hubiera muy poca diferenciación en la condición de control en la que EGF y bFGF se mantuvieron en el medio durante todo el procedimiento, ya que este es normalmente un medio de expansión. Aunque se observó que aproximadamente un 70% de las células conservaba su estado de progenitora (nestina+), aproximadamente un 30% fueron GFAP+ (indicativo de astrocitos). Esto puede deberse al hecho de que tal expansión significativa se produjo durante todo el procedimiento que el contacto entre progenitoras inducía esta diferenciación. Se han notificado resultados similares en la bibliografía (2).

Referencias para el Ejemplo 23

- 45 (1) Paxinos, G. y Watson, C. (1997). THE RAT BRAIN IN STEREOTAXIC COORDINATES.
(2) Song, H. *et al.* (2002). Nature. 417(6884): 39-44.

EJEMPLO 24

Ensayo de formación de red endotelial

55 La angiogénesis, o formación de nueva vasculatura, es necesaria para el crecimiento de nuevo tejido. La inducción de la angiogénesis es un objetivo terapéutico importante en muchos estados patológicos. El presente estudio tiene como objetivo identificar la posible actividad angiogénica de las células derivadas de la placenta en ensayos *in vitro*. El estudio siguió un método bien establecido de siembra de células endoteliales sobre una placa de cultivo recubierta con MATRIGEL (BD Discovery Labware, Bedford, MA), un extracto de membrana basal (Nicosia y Ottinetti (1990) *In vitro Cell Dev. Biol.* 26(2): 119-28). El tratamiento de las células endoteliales en MATRIGEL (BD Discovery Labware, Bedford, MA) con factores angiogénicos estimula las células para que formen una red que es similar a los capilares. Este es un ensayo *in vitro* común para el ensayo de estimuladores 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 cocultivo con las células derivadas de la placenta sembradas sobre insertos de pocillo de cultivo. Estos insertos permeables permiten el intercambio pasivo de componentes de los medios entre el endotelio y los medios de cultivo derivados de placenta.

Materiales y métodos

Cultivo celular

Células derivadas de la placenta. Se recibieron placentas humanas y se aislaron las células como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 1). Las células se cultivaron en Medio de crecimiento (medio esencial modificado de Dulbecco (DMEM Invitrogen, Carlsbad, CA), suero bovino fetal al 15% (v/v) (Hyclone, Logan UT), 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomycin (Invitrogen), 2-mercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma, St. Louis, MO)) en matraces de plástico de cultivo tisular recubiertos con gelatina. Los cultivos se incubaron a 37°C con CO₂ al 5%. Las células utilizadas para los experimentos se encontraban entre los pases 4 y 12.

Se tripsinizaron células derivadas de la placenta en crecimiento activo, se contaron y se sembraron en insertos de cultivo tisular de 6,5 milímetros de diámetro COSTAR TRANSWELL (Corning, Corning, NY) a razón de 15.000 células por inserto. Las células se cultivaron en los insertos durante 48 a 72 horas en medios de crecimiento en atmósfera normal con CO₂ al 5% a 37°C.

Células madre mesenquimales humanas (hMSC). Se adquirieron hMSC de Cambrex (Walkersville, MD) y se cultivaron en MSCGM (Cambrex). Los cultivos se incubaron en atmósfera normal con CO₂ al 5% a 37°C.

Se tripsinizaron MSC en crecimiento activo, y se contaron y sembraron sobre insertos de cultivo tisular de 6,5 milímetros de diámetro Costar® Transwell® (Corning, Corning, NY) a razón de 15.000 células por inserto. Las células se cultivaron en los insertos durante 48 a 72 horas en medios de crecimiento en atmósfera normal con CO₂ al 5% a 37°C.

Células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC). Se obtuvieron HUVEC de Cambrex (Walkersville, MD). Las células se cultivaron en cultivos separados, en medios para células endoteliales EGM o EBM (Cambrex). Las células se cultivaron sobre plástico de cultivo tisular convencional en atmósfera normal con CO₂ al 5% a 37°C. Las células utilizadas en el ensayo se encontraban entre los pases 4 y 10.

Células endoteliales de arteria coronaria humana (HCAEC). Se adquirieron HCAEC de Cambrex Incorporated (Walkersville, MD). Estas células también se mantuvieron en cultivos separados, en formulaciones de medios EGM o EBM. Las células se cultivaron sobre plástico de cultivo tisular convencional en atmósfera normal con CO₂ al 5% a 37°C. Las células utilizadas para los experimentos se encontraban entre los pases 4 y 8.

Ensayos de formación de red endotelial (MATRIGEL). Se recubrieron placas de cultivo con MATRIGEL (BD Discovery Labware, Bedford, MA) según las especificaciones del fabricante. En resumen, se descongeló MATRIGEL (BD Discovery Labware, Bedford, MA) a 4°C y se alicuotaron aproximadamente 250 microlitros y se distribuyeron uniformemente en 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 tripsinizaron los cultivos de células endoteliales en crecimiento activo y se realizó el recuento. Las células se lavaron dos veces en medios de crecimiento con FBS al 2%, seguido de centrifugación, resuspensión y aspiración del sobrenadante. Las células se sembraron en los pocillos recubiertos a razón de 20.000 células por pocillo en aproximadamente 0,5 mililitros de Medio de crecimiento con FBS al 2% (v/v). A continuación, las células se incubaron durante aproximadamente 30 minutos para permitir que las células se asentaran.

A continuación, los cultivos de células endoteliales se trataron con bFGF humano 10 nanomolar (Peprotech, Rocky Hill, NJ) o con VEGF humano 10 nanomolar (Peprotech, Rocky Hill, NJ) para que hiciera de control positivo para la respuesta de las células endoteliales. Se añadieron insertos Transwell sembrados con células derivadas de la placenta a pocillos apropiados con Medio de crecimiento con FBS al 2% en la cámara del inserto. Los cultivos se incubaron en atmósfera normal con CO₂ al 5% a 37°C durante aproximadamente 24 horas. La placa de pocillos se sacó de la incubadora, y se tomaron imágenes de los cultivos de células endoteliales con un microscopio invertido Olympus (Olympus, Melville, NY).

Resultados

En un sistema de cocultivo con células derivadas de la placenta, las HUVEC forman redes de células. Las células HUVEC forman redes de células limitadas en experimentos de cocultivo con hMSC y con bFGF 10 nanomolar. Las células HUVEC sin ningún tratamiento mostraron muy poca o nula formación de redes. Estos resultados sugieren que las células derivadas de la placenta liberan factores angiogénicos que estimulan a las HUVEC.

En un sistema de cocultivo con células derivadas de la placenta, las CAEC forman redes de células.

La Tabla 24-1 muestra los niveles de factores angiogénicos conocidos liberados por las PDC en Medio de crecimiento. Se sembraron células derivadas de la placenta sobre insertos como se ha descrito anteriormente. Las células se cultivaron a 37°C en oxígeno atmosférico durante 48 horas en los insertos y, a continuación, se cambiaron a un medio con FBS al 2% y se devolvieron a 37°C durante 24 horas. Se extrajo el medio, se congeló

inmediatamente y se almacenó a -80°C , y se analizó mediante el ensayo ELISA multiplexado SEARCHLIGHT (Pierce Chemical Company, Rockford, IL). Los resultados mostrados son las medias de las mediciones por duplicado. Los resultados demuestran que las células derivadas de la placenta no liberan niveles detectables de factor de crecimiento plaquetario bb (PDGF-bb) ni factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HBEGF). Las células sí liberan cantidades mensurables de inhibidor tisular de metaloproteasa-1 (TIMP-1), angiopoyetina 2 (ANG2), trombopoyetina (TPO), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).

Tabla 24-1. Posibles factores angiogénicos liberados a partir de células derivadas de la placenta. Las células se cultivaron en 24 horas en medios con FBS al 2% en oxígeno atmosférico. El medio se extrajo y se ensayó mediante ensayo ELISA multiplexado SEARCHLIGHT (Pierce). Los resultados son las medias de un análisis por duplicado. Los valores son las concentraciones en los medios presentadas en picogramos por mililitro de los medios de cultivo.

	TIMP1 (pg/ml)	ANG2 (pg/ml)	PDGF-BB (pg/ml)	TPO (pg/ml)	KGF (pg/ml)	HGF (pg/ml)	FGF (pg/ml)	VEGF (pg/ml)	HBEGF (pg/ml)
Plac (P4)	91655,3	175,5	<2,0	275,5	3,0	58,3	7,5	644,6	<1,2
Plac (P11)	1592832,4	28,1	<2,0	1273,1	193,3	5960,3	34,8	12361,1	1,7
Medio solo	<9,8	25,1	<2,0	<6,4	<2,0	<3,2	<5,4	<4,0	<1,2

La Tabla 24-2 muestra los niveles de factores angiogénicos conocidos liberados por las PDC. Se sembraron PDC sobre insertos como se ha descrito anteriormente. Las células se cultivaron en Medio de crecimiento a una concentración de oxígeno del 5% durante 48 horas en los insertos y, a continuación, se cambiaron a un medio con FBS al 2% y se devolvieron a incubación con O_2 al 5% durante 24 horas. Se extrajo el medio, se congeló inmediatamente y se almacenó a -80°C , y se analizó mediante ensayo ELISA multiplexado SEARCHLIGHT (Pierce Chemical Company, Rockford, IL). Los resultados mostrados son las medias de las mediciones por duplicado. Los resultados demuestran que las células derivadas de la placenta no liberan niveles detectables de factor de crecimiento plaquetario bb (PDGF-bb) ni factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HBEGF). Las células sí liberan cantidades mensurables de inhibidor tisular de metaoloproteasa-1 (TIMP-1), angiopoyetina 2 (ANG2), trombopoyetina (TPO), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).

Tabla 24-2. Posibles factores angiogénicos liberados a partir de células derivadas de la placenta. Las células se cultivaron en 24 horas en medios con FBS al 2% en oxígeno al 5%. El medio se extrajo y se ensayó mediante el ensayo ELISA multiplexado SEARCHLIGHT (Pierce). Los resultados son las medias de un análisis por duplicado. Los valores son las concentraciones en los medios presentadas en picogramos por mililitro de los medios de cultivo.

	TIMP1 (pg/ml)	ANG2 (pg/ml)	PDGF-bb (pg/ml)	TPO (pg/ml)	KGF (pg/ml)	HGF (pg/ml)	FGF (pg/ml)	VEGF (pg/ml)	HBEGF (pg/ml)
Plac (P4)	72972,5	253,6	<2,0	743,1	2,5	30,2	15,1	1495,1	<1,2
Plac (P11)	458023,1	55,1	<2,0	2562,2	114,2	2138,0	295,1	7521,3	1,8
Medio solo	<9,8	25,1	<2,0	<6,4	<2,0	<3,2	<5,4	<4,0	<1,2

Resumen. Los resultados demuestran que las células derivadas de la placenta pueden estimular tanto las células de vena umbilical humana como las endoteliales de arteria coronaria para que formen redes en un ensayo MATRIGEL *in vitro* (BD Discovery Labware, Bedford, MA). Este efecto es similar al observado con factores angiogénicos conocidos en este sistema de ensayo. Estos resultados sugieren que las PDC son útiles para estimular la angiogénesis *in vivo*.

EJEMPLO 25

Trasplante de células derivadas de la placenta bajo la cápsula renal

El trasplante de islotes pancreáticos a la cápsula renal se realiza de manera rutinaria para evaluar metodologías de trasplante para el tratamiento de la diabetes (Refaie *et al.* (1998) *Trans. Proc.* 30:400-403). Además de los islotes pancreáticos, otras células pueden diferenciarse a células secretoras de insulina capaces de mantener la homeostasis de la glucosa en sangre. El propósito de este estudio era determinar si las células derivadas de la placenta humana podrían sobrevivir cuando se implantan bajo la cápsula renal en ratones inmunodeficientes. Además, las células derivadas de la placenta se mezclaron con células CD34+ movilizadas con GM-CSF para determinar si estas células podían estimular la vascularización y la supervivencia de las células derivadas de la placenta.

Métodos y materiales

Cultivo celular. Se sacaron del almacenamiento en nitrógeno líquido células derivadas de la placenta crioconservadas (aislado 1, P10) y se cultivaron en Medio de crecimiento (DMEM con bajo contenido de glucosa (Gibco Carlsbad CA), suero bovino fetal al 15% (v/v) (Hyclone, Logan, UT), betamercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma, St Louis, MO), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin (Gibco)) en matracas T225 (Corning, Corning, NY) recubiertos con gelatina (Sigma) hasta la confluencia.

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

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

Preparación de los animales

Ratones (Mus musculus)/Fox Chase SCID/macho (Harlan Sprague Dawley, Inc., Indianápolis, Indiana), de 8 semanas de edad. Todas las manipulaciones de los ratones SCID tuvieron 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 inducir la anestesia, se cortó el pelo de toda la parte posterior del animal desde la zona cervical dorsal hasta la zona lumbosacra dorsal con una esquiladora eléctrica. La zona se limpió con diacetato de clorhexidina, se aclaró con alcohol, se secó y se untó con una solución acuosa de yodóforo del 1% de yodo disponible. Se aplicó a los ojos una pomada oftálmica para evitar que se secase el tejido durante el período de anestesia. El animal anestesiado y preparado quirúrgicamente se colocó en la posición reclinada deseada. Se practicó una incisión transversal en el lado abdominal izquierdo, aproximadamente 2 cm en dirección caudal a la caja torácica del animal. Se expuso el riñón y se perforó la cápsula con una aguja de calibre 26. Se utilizó una lanceta de cápsula (punta de pipeta de vidrio modificada) para crear un espacio debajo de la cápsula renal en el que se introdujeron las células. Las células se inyectaron mediante una jeringa con una punta de micropipeta fijada. El bolsillo se cerró por haciendo pasar un cauterio oftálmico (Aaron Medical Industries, San Petersburgo, Florida) sobre la abertura (sin tocar el riñón). El riñón se colocó de nuevo en la posición anatómica correcta y se suturó la capa muscular. La piel se cerró con grapas quirúrgicas.

El diseño experimental comprendió un trasplante de células por ratón (Tabla 25-1); cuatro tratamientos con un valor n de 4 por tratamiento; y tres instantes de tiempo (1, 14 y 30 días).

Se sacrificó a los ratones en sus intervalos establecidos mediante inhalación de dióxido de carbono. Se extirparon los sitios de implantación renal y se congelaron para la histología.

Inmunohistoquímica. Los sitios de implantación renal congelados se incluyeron sobre el borde ("on edge") en compuesto O.C.T. (Sakura, Torrance, CA). El tejido renal se recortó mediante crio-seccionamiento para producir una sección de cinco micrómetros de la zona de implantación y el tejido adyacente. Las secciones producidas se fijaron en paraformaldehído al 4% recién 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 suero de cabra al 3% en solución de bloqueo PBS durante una hora. La solución de bloqueo se eliminó mediante aspiración suave. Las secciones se incubaron en anticuerpo contra núcleos humanos (Chemicon International, Temecula, CA) diluido 1:100 en solución de bloqueo durante una hora. Las secciones se lavaron con PBS y se incubaron en anticuerpo IgG de cabra contra ratón marcado con fluorescencia (Molecular Probes Eugene, OR) diluido 1:200 en solución de bloqueo durante 30 minutos en ausencia de luz. Las secciones se lavaron en PBS y se incubaron en DAPI 10 micromolar (Molecular Probes Eugene, OR) durante cinco minutos. Las secciones se lavaron en PBS y se examinaron mediante microscopía de fluorescencia.

Tinción tricromo. Los sitios de implantación renal congelados se incluyeron sobre el borde en compuesto O.C.T. (Sakura Torrance, CA). El tejido renal se cortó mediante crio-seccionamiento para producir una sección de cinco micrómetros de la zona de implantación y el tejido adyacente. Las secciones producidas se fijaron en formalina tamponada neutra al 10% (Richard-Allan Scientific Kalamazoo, MI) durante 15 minutos. Las secciones se tiñeron con tricromo (Poly Scientific, Bay Shore, NY) utilizando los métodos del fabricante.

Tabla 25-1. Esquema de trasplante de células en la cápsula renal de ratones SCID

Animal (nº)	Días después del trasplante	Cápsula renal (izquierda)
1	1	1
2	1	1
3	1	1
4	1	1
5	14	1
6	14	1
7	14	1
8	14	1
9	30	1
10	30	1
11	30	1
12	30	1
13	1	2
14	1	2
15	1	2
16	1	2
17	14	2
18	14	2
19	14	2
20	14	2
21	30	2
22	30	2
23	30	2
24	30	2

Tratamientos:

- 1. 3×10^3 células de placenta
- 2. 3×10^3 células de placenta + 3×10^3 células CD34+

Animal añadido nº 25-27 como control (sin células)

Resultados

La viabilidad de las células derivadas de la placenta fue de ~ 75% y la de las células CD34+ fue del 95%. Los primeros intentos de trasplantar 1×10^6 células viables no tuvieron éxito debido al tamaño inadecuado de la cápsula renal para alojar las células. Las células se trasplantaron en un plazo de 3 horas desde la tripsinización. Se observó al microscopio la ubicación de las células derivadas de la placenta bajo la cápsula renal. No hubo diferencias evidentes en el número y la distribución de las células derivadas de la placenta con o sin células CD34+ en cada instante de tiempo. Hubo una evidente disminución del número de células a lo largo del tiempo.

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

Resumen. El trasplante de células en la cápsula renal tuvo éxito. Se trasplantaron bajo la cápsula del riñón células derivadas de la placenta indiferenciadas (3×10^3) tratadas previamente con factores de crecimiento con o sin 3×10^3 células CD34+ movilizadas con GM-CSF. Se sacrificó a los animales 1, 14 y 30 días después del trasplante de células. Las células sobrevivieron a los 1, 14 y 30 días con una evidente reducción del número de células a los 30 días. La presencia de células CD34+ movilizadas con GM-CSF no afectó a la supervivencia de las células derivadas de la placenta. Este estudio demuestra que las células derivadas de la placenta pueden trasplantarse a la cápsula renal.

Ejemplo 26

Trasplante de células derivadas de la placenta

Las células derivadas de la placenta posparto son útiles para las terapias regenerativas. Se evaluó el tejido producido por las células derivadas de la placenta trasplantadas en ratones SCID con un material biodegradable.

Los materiales evaluados fueron VICRYL no tejido, espuma 35/65 PCL/PGA e hidrogel de péptidos de autoensamblaje RAD 16.

Métodos y materiales

5 **Cultivo celular.** Se cultivaron células derivadas de la placenta en Medio de crecimiento (DMEM con bajo contenido de glucosa (Gibco Carlsbad CA), suero bovino fetal al 15% (v/v) (nº de cat. SH30070.03 Hyclone, Logan, UT), betamercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma, St Louis, MO), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomina (Gibco)) en matraces recubiertos con gelatina (Corning).

10 **Preparación de la matriz.** Se preparó un armazón de no tejido utilizando una técnica de punzonado tradicional como se describe más adelante. Las fibras, compuestas por un copolímero absorbible sintético de ácidos glicólico y láctico (PGA/PLA), comercializado con el nombre comercial VICRYL, se obtuvieron de Ethicon, Inc. (Somerville, NJ). Las fibras eran filamentos de aproximadamente 20 micrómetros de diámetro. A continuación, las fibras se cortaron y rizaron en longitudes uniformes de 2 pulgadas para formar una fibra discontinua de 2 pulgadas. A continuación, se preparó una matriz no tejida punzonada tendida en seco utilizando las fibras discontinuas VICRYL. Las fibras discontinuas se abrieron y se cardaron en una maquinaria para no tejidos convencional. El fieltro resultante estaba en forma de fibras discontinuas en banda. Las fibras discontinuas en banda se punzaron para formar el armazón de no tejido punzonado tendido en seco. El armazón de no tejido se aclaró en agua, seguido de otra incubación en etanol para eliminar cualquier residuo químico o coadyuvante de procesamiento utilizado durante el proceso de fabricación.

20 Las espumas, compuestas por copolímero 35/65 de poli(epsilon-caprolactona)/poli(ácido glicólico) (35/65 PCL/PGA), se formaron mediante el proceso de liofilizado, como se analiza en la patente de Estados Unidos Nº 6.355.699.

25 **Preparación de muestras.** Se sembraron un millón de células viables en 15 microlitros de Medio de crecimiento sobre armazones de no tejido de 2,25 milímetros de espesor y 5 milímetros de diámetro, (64,33 miligramos/centímetro cúbico) o discos de espuma 35/65 PCL/PGA de 5 milímetros de diámetro. Se dejó que las células se fijaran durante dos horas antes de añadir más Medio de crecimiento para cubrir los armazones. Las células se cultivaron en los armazones durante la noche. También se incubaron en el medio armazones sin células.

30 Se obtuvieron péptidos de autoensamblaje RAD16 (3D Matrix, Cambridge, MA en virtud de un acuerdo de transferencia de materiales) como una solución estéril al 1% (p/v) en agua, que se mezcló 1:1 con 1×10^6 células en sacarosa al 10% (p/v) (Sigma, St. Louis, MO), HEPES 10 milimolar en medio modificado de Dulbecco (DMEM; Gibco) inmediatamente antes de utilizarse. La concentración final de células en el hidrogel RAD16 fue de 1×10^6 células/100 microlitros.

35 **MATERIAL DE ENSAYO (N = 4/Rx)**

- 40
1. No tejido VICRYL + 1×10^6 células derivadas de la placenta
 2. Espuma 35/65 PCL/PGA + 1×10^6 células derivadas de la placenta
 3. Péptido de autoensamblaje RAD 16 + 1×10^6 células derivadas de la placenta
 - 45 4. Espuma 35/65 PCL/PGA
 5. No tejido VICRYL

50 **Preparación de los animales.** Los animales utilizados en este estudio se manejaron y mantuvieron según los requisitos actuales de la Ley de Bienestar Animal (Animal Welfare Act). El cumplimiento de las Leyes Públicas anteriormente indicadas se llevó a cabo acatando las normas de Bienestar Animal (9 CFR) y ajustándose a las normas vigentes promulgadas en el documento "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals", 7ª edición.

55 **Ratones (Mus musculus)/Fox Chase SCID/macho (Harlan Sprague Dawley, Inc., Indianápolis, Indiana), de 5 semanas de edad.** Todas las manipulaciones de los ratones SCID tuvieron 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 inducir la anestesia, se cortó el pelo de toda la parte posterior del animal desde la zona cervical dorsal hasta la zona lumbosacra dorsal con una esquiladora eléctrica. A continuación, la zona se limpió con diacetato de clorhexidina, se aclaró con alcohol, se secó y se untó con una solución acuosa de yodóforo del 1% de yodo disponible. Se aplicó a los ojos una pomada oftálmica para evitar que se secase el tejido durante el período de anestesia.

60 **Técnica de implantación subcutánea.** Se practicaron cuatro incisiones cutáneas sobre el dorso de los ratones, cada una de aproximadamente 1,0 cm de longitud. Se localizaron transversalmente dos sitios del cráneo sobre la región torácica lateral dorsal, aproximadamente 5 mm en dirección caudal al borde inferior palpado de la escápula, uno a la izquierda y otro a la derecha de la columna vertebral. Otros dos se localizaron transversalmente

sobre la zona del músculo del glúteo a nivel sacro-lumbar caudal, aproximadamente 5 mm en dirección caudal a la cresta ilíaca palpada, uno a cada lado de la línea media. Se colocaron implantes al azar en estos sitios. La piel se separó del tejido conectivo subyacente para crear un pequeño bolsillo y se colocó el implante (o se inyectó para RAD16) aproximadamente 1 cm en dirección caudal a la incisión. El material de ensayo apropiado se implantó en el espacio subcutáneo. La incisión cutánea se cerró con grapas metálicas.

Alojamiento de los animales. Los ratones se alojaron individualmente en jaulas Micro-Isolator durante todo el estudio dentro de un intervalo de temperaturas de 64°F - 79°F y una humedad relativa del 30% al 70%, y se mantuvieron en un ciclo aproximado de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad. La temperatura y la humedad relativa se mantuvieron dentro de los intervalos indicados en la mayor medida posible. La dieta consistió en pienso para roedores Pico Mouse Chow 5058 (Purina Co.) irradiado y agua, suministrados a discreción.

Se sacrificó a los ratones en sus intervalos establecidos mediante inhalación de dióxido de carbono. Se extirparon los sitios de implantación subcutánea con su piel suprayacente y se congelaron para la histología.

Histología. La piel extirpada con el implante se fijó con formalina tamponada neutra al 10% (Richard Allan-Kalamazoo, MI). Las muestras con el tejido suprayacente y adyacente se bisecaron centralmente, se procesaron en parafina y se incluyeron sobre la superficie cortada utilizando métodos de rutina. Se obtuvieron secciones de tejido de cinco micrómetros mediante microtomo y se tiñeron con hematoxilina y eosina (Poly Scientific Bay Shore, NY) utilizando métodos de rutina.

Resultados

Hubo una increscencia mínima de tejido en las espumas implantadas subcutáneamente en los ratones SCID al cabo de 30 días. Por el contrario, hubo un extenso relleno de tejido en las espumas implantadas con células derivadas de la placenta

Hubo cierta increscencia de tejido en los armazones de no tejido VICRYL. Los armazones de no tejido sembrados con células derivadas de la placenta presentaron un aumento de deposición de matriz y de vasos sanguíneos maduros.

No fue posible identificar el punto de inyección de RAD16 y células.

Resumen. El fin de este estudio fue determinar el tipo de tejido formado por las células derivadas de placenta humana en los armazones en ratones inmunodeficientes. Se sembraron discos de no tejido/espuma absorbibles sintéticos (5,0 milímetros de diámetro x 1,0 milímetros de espesor) o hidrogel de péptidos de autoensamblaje con células derivadas de placenta humana y se implantaron subcutáneamente de forma bilateral en la región dorsal de la columna de los ratones SCID. Se ha demostrado que las células derivadas de la placenta pueden aumentar espectacularmente la formación de tejido de buena calidad en armazones biodegradables.

EJEMPLO 27

Evaluación de las células derivadas de la placenta para el tratamiento cardiovascular en un modelo de ligadura coronaria en roedores

Se evaluó la eficacia del tratamiento intracardíaco con células derivadas de la placenta humana cuando se administraban 15 minutos después de la oclusión de la arteria coronaria en un modelo de roedor de infarto/isquemia de miocardio.

Métodos y materiales

El Centro de Ensayos Charles River Worcester, MA, está acreditado por la asociación Internacional para la evaluación y acreditación del cuidado de animales de laboratorio (AAALAC) y registrado en el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos para llevar a cabo la investigación en animales de laboratorio. Todas las condiciones de ensayo se ajustan a la Ley de Bienestar Animal (9 CFR) y sus enmiendas. El protocolo fue revisado y autorizado por el comité institucional para el uso y cuidado de animales de laboratorio (IACUC) en el Centro de Ensayos para el cumplimiento de la normativa antes de iniciar el estudio.

Los animales con las características identificadas en la Tabla 27-1 se alojaron individualmente en jaulas Micro-Isolator en lechos esterilizados en autoclave. Las jaulas se ajustan a las normas establecidas en The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Tabla 27-1. Características de los animales

5	Especie:	<i>Rattus norvegicus</i>
	Cepa:	Rnu
	Fuente:	Charles River Laboratories
	Edad en el momento de la administración:	6-8 semanas
	Peso en el momento de la administración:	~200-250 gramos
	Número de machos (incluidos los de reserva):	40 + 10

10 Se proporcionó a discreción a la animales Purina Certified Diet (irradiado). Esta dieta era analizada de manera rutinaria por el fabricante para determinar los componentes nutricionales y los contaminantes ambientales. Los resultados de los análisis del fabricante están archivados en el Centro de Ensayos. Se proporcionó a discreción agua del grifo filtrada y esterilizada en autoclave. Las muestras del agua filtrada se analizaron para determinar el total de sólidos disueltos, la dureza, el contenido microbiológico especificado y los contaminantes ambientales seleccionados. Los resultados de estos análisis se encuentran archivados en el Centro de Ensayos.

15 Se establecieron controles ambientales para mantener las temperaturas de 18°C a 26°C (64°F a 79°F) con una 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 los animales. Tras la recepción y antes de su uso en el estudio, se mantuvo a los animales durante un mínimo de cuatro días para su acondicionamiento según el Programa de Gestión de Proveedores del Centro de Ensayos como se describe en el Procedimiento Normalizado de Trabajo, Recepción, Acondicionamiento y Cuarentena de Animales de Laboratorio del Centro de Ensayos.

20 Se identificó cada animal mediante un número único y este número se indicó mediante un perforador de orejas. Se asignó a los animales al azar en grupos mediante una distribución ordenada por peso de manera que los pesos corporales individuales no superan $\pm 20\%$ del peso medio.

25 Se anestesió a los animales con pentobarbital sódico (40 miligramos/kilogramo) y buprenorfina (0,05 miligramos/kilogramo) como un solo cóctel administrado por vía intramuscular (IM). Una vez establecida la anestesia, se intubó a los animales utilizando un Angiocath de 2 pulgadas de longitud y calibre 18-16, o un Angiocath de tamaño apropiado, y se mantuvieron con respiración de aire ambiental (complementado con oxígeno) y un respirador de presión positiva durante todo el procedimiento quirúrgico. Se proporcionó anestesia adicional progresivamente, según fuese necesario. También se administró tratamiento antibiótico preoperatorio, penicilina G benzatina/procaína, 40.000 unidades/kilogramo, IM. Se administró tratamiento antibiótico adicional cada 48 horas.

30 Se colocaron almohadillas de electrodo alrededor de las patas apropiadas de los animales para recibir una señal de electrocardiograma (ECG) útil. Se colocó a los animales en una almohadilla térmica para ayudar a mantener la temperatura corporal durante todo el procedimiento. Se insertó en el animal una sonda de temperatura rectal para controlar la temperatura corporal. Se administró a cada ojo pomada oftálmica. Se prepararon los sitios quirúrgicos (zona torácica) para la cirugía aséptica eliminando cualquier exceso de piel, y limpiando suavemente la zona con esponjas que se habían empapado en alcohol isopropílico al 70%, que se dejó secar. A continuación, se aplicó a la zona Medi Sepps™ o una solución similar y también se dejó secar. La zona se cubrió adecuadamente para la cirugía con asepsia estricta.

35 Se practicó una incisión quirúrgica en la piel sobre el cuarto espacio intercostal. Se utilizó la disección roma a través de las capas musculares 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 con cuidado el pericardio separándolo suavemente con hisopos de algodón humedecidos en solución salina estéril. Se utilizó un hisopo de algodón húmedo para empujar suavemente el ápex del corazón al interior de la abertura donde se fijó un tramo de sutura de seda 6-0 en el miocardio para manipular el corazón. Después de una pausa para permitir que el corazón se recuperase, se utilizó la sutura colocada en el ápex para facilitar sacar el corazón de la cavidad torácica y para ejercer tensión suficiente sobre el corazón para permitir el acceso a la parte superior corazón y a la arteria coronaria descendente anterior (LAD). Se colocó otro tramo de sutura de seda 6-0 en el miocardio de manera que rodease la LAD. Se liberó la presión en la sutura apical y se devolvió el corazón al interior de la cavidad torácica.

40 Una vez que la frecuencia cardíaca y el ECG volvieron a los valores basales, se ataron las ligaduras alrededor de la LAD para ocluir la LAD. Esta fue una oclusión permanente con la sutura atada y los extremos recortados. Una vez atada la ligadura, el cirujano buscó los siguientes indicios de oclusión exitosa: cambios en el color de la zona del corazón directamente debajo de la ligadura a un color blanco/blanco grisáceo como resultado de la interrupción del flujo sanguíneo a la zona y un cambio significativo en el ECG que correspondía a la oclusión de la LAD. Pueden haberse desarrollado arritmias en los primeros 10 minutos de la oclusión. La rata se vigiló atentamente durante este período de tiempo en el caso de que fuese necesaria la reanimación. En caso de arritmia grave e incapacidad de la rata para volver al ritmo sinusal normal sin ayuda, se le ayudó mediante masaje cardíaco. Aproximadamente 15 minutos después del inicio de la oclusión LAD, la zona del ventrículo izquierdo isquemizada se trató con vehículo o artículo de ensayo mediante inyección directa en el miocardio isquémico. El tratamiento consistió en tres a diez inyecciones intramiocárdicas (100 microlitros/inyección) en la zona isquémica del miocardio.

Se cultivaron células humanas en Medio de crecimiento (DMEM con bajo contenido de glucosa (Gibco, Carlsbad CA), suero bovino fetal al 15% (v/v) (nº de cat. SH30070.03, Hyclone, Logan UT), betamercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma, St. Louis, MO), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomina (Gibco, Carlsbad CA), en matraces T300 recubiertos con gelatina. Las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS, Gibco, Carlsbad CA) y se tripsinizaron utilizando tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad CA). La tripsinización se detuvo añadiendo Medio de crecimiento. Las células se centrifugaron a 150 x g, el sobrenadante se eliminó y el sedimento celular 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). Se estimó el número de células viables utilizando un hemocitómetro. Se centrifugó la suspensión celular y se resuspendió en 1 mililitro de Medio de crecimiento que contenía DMSO al 10% (v/v) (Hybrimax, Sigma, St. Louis, MO) por 5 millones de células y se transfirieron a crioviales (Nalgene). Las células se enfriaron a aproximadamente 1°C/minuto durante la noche en un congelador a -80°C utilizando un recipiente de congelación "Mr Frosty" (Nalgene, Rochester, NY). Los viales de células se transfirieron a nitrógeno líquido. Los viales se enviaron desde CBAT, Somerville, NJ a Charles River, Worcester, MA en hielo seco y se almacenaron a -80°C. Aproximadamente 1-2 horas antes de la inyección de las células en el animal, se descongeló un vial de células rápidamente en un baño de agua 37°C. En condiciones asépticas en una cabina de bioseguridad BSL2, se añadieron las células a 40 mililitros de PBS con calcio y magnesio (Sigma St. Louis, MO) y se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos antes de resuspender el sedimento celular en 10 mililitros de PBS. Se estimó el número de células y su viabilidad 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 10⁶ células viables/100 microlitros. La suspensión celular se cargó en jeringas de 1 mililitro con una aguja 30G y se mantuvo en hielo. La viabilidad se evaluó de nuevo hasta las 5 horas en hielo.

Después de administrar el tratamiento (Tabla 27-2) y estabilizar el corazón, el cirujano comenzó a cerrar la incisión quirúrgica. Se eliminó el retractor. Se insufló aire en los pulmones durante 3 - 4 respiraciones y se inspeccionaron visualmente todo lo posible para garantizar que se habían vuelto a inflar completamente. Esto creó la presión negativa necesaria para evitar el neumotórax después de la recuperación. Para evacuar el líquido y el exceso de aire de la cavidad torácica después de cerrar la cavidad, se colocó un catéter intravenoso (es decir, calibre 20, 2 milímetros de longitud) a través de las capas de piel y músculo de manera que la punta permaneciese en la cavidad torácica. Se tuvo cuidado para que la punta no perforase el pulmón ni el corazón. Se suturaron las costillas separadas y el músculo asociado con sutura una apropiada. Las capas superiores de músculo se suturaron utilizando un patrón continuo simple. La piel se cerró con seda 4-0 utilizando un patrón de punto colchonero horizontal. Se fijó una jeringa de 10 mililitros al catéter intravenoso que había sido colocado previamente en la cavidad torácica y se tiró lentamente del émbolo para sacar los líquidos y el aire de la cavidad. Al mismo tiempo, se sacó lentamente el catéter del sitio de entrada, permitiendo así que la piel y la masa muscular circundante sellasen la punción. Se quitó el paño quirúrgico y se administraron líquidos (es decir, solución de Ringer con lactato, 25 mililitros/kilogramo por vía subcutánea [SC] o por vía intraperitoneal [IP]).

Tabla 27-2. Regímenes de tratamiento

Gr. Nº.	Nº de machos	Artículo de ensayo	Nivel de dosificación (células/animal)	Conc. de dosis (células/ml)	Vía/régimen de dosis	Momento de administración del tratamiento	Día de la necropsia
1	8	Vehículo	0	0	Inyección(es) directa(s) en la región isquémica del ventrículo izquierdo del corazón, que consiste(n) en 3 a 10 inyecciones intramiocárdicas de 100 microlitros en total	15 minutos después de la ligadura de la arteria coronaria	Día 28 (± 1 día)
2	8	Placenta nº 4 (P10) (A)	1 millón	10 millones			
3	8	Placenta nº 3 (P10) (C)					
4	8	Fibroblastos humanos 1F1853 (P10) (D)					
Gr. = Grupo; Nº = Número; Conc. = Concentración							

Inmediatamente después de haber sometido cada rata a un tratamiento con el artículo de ensayo y suturar la incisión, se sometió al animal a una ecocardiografía (ECG). La anestesia se mantuvo durante toda la ecocardiografía. Una vez finalizada la ecocardiografía, se interrumpió la ventilación, y la rata se devolvió a la zona de recuperación para que se recuperase en una jaula de recuperación climatizada y oxigenada.

Se llevó a cabo una segunda ecocardiografía de cada animal superviviente al final del estudio (aproximadamente 28 días después del tratamiento), antes de la terminación. Durante el segundo examen, se anestesió a los animales como se ha descrito anteriormente.

Para cada ecocardiografía, se afeitó y se calentó la zona torácica izquierda, se aplicó gel de ultrasonido a la piel para mejorar el contacto con el transductor. Se colocaron almohadillas de electrodos alrededor de las

extremidades apropiadas para recibir una señal ECG. Las imágenes ecocardiográficas incluían vistas del eje corto y del eje largo para permitir determinar las dimensiones de la cavidad ventricular, la contractilidad, el flujo de sangre a través de la vasculatura y el espesor de la pared. Estas imágenes se guardaron en un disco óptico para su posterior análisis. Después del examen, se eliminó de la piel el medio de gel con una gasa o toallita de papel. La rata se sacó del respirador y se colocó en una jaula de recuperación climatizada hasta recuperar la movilidad.

Al concluir los procedimientos quirúrgicos, se desactivó la ventilación respiratoria. Se observó a los animales para determinar el reflejo flexor. Posteriormente se quitaron la sonda rectal y los electrodos ECG, y se extubó al animal y se colocó en una jaula de recuperación oxigenada y calentada. Después de recuperarse completamente de la anestesia, se dio a los animales buprenorfina (0,05 miligramos/kilogramo, SC). Se realizaron observaciones regularmente hasta que los animales mostraron total movilidad e interés por la comida y el agua. A continuación, se colocó a los animales en una jaula de alojamiento limpia y se devolvieron a la sala de alojamiento de animales. Se vigiló a los animales para determinar la integridad de la incisión quirúrgica dos veces al día después de la cirugía.

Se administró analgésicos (es decir, buprenorfina, 0,05 miligramos/kilogramo SC) dos veces al día durante 4 días después de la operación y posteriormente cuando fue necesario. Los indicios visuales de dolor posoperatorio incluían ausencia de posturas corporales normales y de movimiento (por ejemplo, el animal permanece en posición encorvada), hostilidad, no comer/beber, falta de acicalamiento, etc.

Se registró el peso corporal para cada animal antes del tratamiento inicial, posteriormente cada semana, y el día de la necropsia. Se pesó a los animales que se encontraron muertos y se les practicó la autopsia.

Para recoger el corazón, se anestesió a cada rata al igual que para la cirugía. Se canuló la vena yugular. Se detuvo el corazón en diástole con cloruro potásico infundido por la cánula yugular. A continuación, se sacó el corazón de la cavidad torácica. A continuación, se realizó una necropsia limitada en el corazón después de lo cual se colocó el corazón en formalina tamponada neutra al 10%. 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 paraformaldehído al 4% hasta que sea evaluaron. A continuación, se desechó el resto de cada cadáver sin evaluación adicional.

Histología y análisis de imágenes. Los tejidos fijados seccionados con una matriz de soporte coronal para corazón de acero inoxidable (Harvard Apparatus Holliston, MA) produjeron cuatro secciones de tejido en serie de dos milímetros de espesor. Las secciones se procesaron y se incluyeron en parafina en serie utilizando métodos rutinarios. Se obtuvieron secciones de cinco micrómetros mediante microtomo y se tiñeron con tricromo de Masson para tejido conectivo (Poly Scientific, Bay Shore, NY) utilizando los métodos del fabricante. Se capturaron microfotografías electrónicas y se analizaron utilizando métodos de análisis de imágenes desarrollados por Phase 3 Imaging System (Glen Mills, PA). Las fotomicrografías de las secciones teñidas con tricromo se analizaron por colorimetría electrónicamente para determinar el área global del ventrículo y la pared libre y el área de la tinción diferencial.

Resultados

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

Se tomaron mediciones de ecocardiografía de las ratas tratadas para el infarto. La fracción de acortamiento de los animales tratados con vehículo tuvo una disminución significativa del $47,7\% \pm 8,3\%$ el día 0 al $23,5\% \pm 30,2\%$ el día 28 ($p < 0,05$). Los animales que se trataron con células derivadas de la placenta presentaron pequeñas diferencias no significativas entre la fracción de acortamiento entre el día 0 y el 28. No hubo diferencia significativa entre la fracción de acortamiento entre los grupos el día 0. Cada grupo tenía ocho animales al comienzo pero algunos no sobrevivieron al experimento. Los animales tratados con fibroblastos experimentaron una mayor mortalidad que los tratados con las PDC.

Los corazones recogidos al final del estudio 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 cardíaca total que comprendía el infarto. El tamaño del infarto en los animales tratados con vehículo fue del $22,9\% \pm 6,7\%$ del área cardíaca, mientras que el tamaño del infarto en los corazones tratados con dos aislados diferentes de células derivadas de la placenta fue del $13,9\% \pm 3,7\%$ y del $12,9\% \pm 3,4\%$, respectivamente, y con fibroblastos fue del $19,3\% \pm 8,0\%$. La diferencia de tamaño del infarto de los animales tratados con células con respecto a los animales tratados con vehículo no fue estadísticamente significativa, como se determina mediante la prueba de la T/ANOVA.

Resumen. Los resultados del presente estudio sugieren que las células derivadas de la placenta tienen algún beneficio en la reducción de los daños de un infarto de miocardio inducido quirúrgicamente en ratas. Los animales tratados con vehículo mostraron una reducción significativa de la función cardiaca el día 28 en comparación con el día 0, tal como se mide mediante la fracción de acortamiento, mientras que los animales tratados con células derivadas de la placenta mostraron cambios mínimos durante el estudio de 28 días. Los animales tratados con fibroblastos mostraron cambios mínimos, pero sólo dos animales sobrevivieron al estudio. La evaluación del tamaño del infarto sugiere que puede haber cierta módica reducción, aunque no estadísticamente significativa, del tamaño del infarto en los animales tratados con células derivadas de la placenta en comparación con los controles con vehículo el día 28. En conjunto, estos datos respaldan la eficacia de las células derivadas de la placenta en la reducción del daño por un infarto de miocardio.

EJEMPLO 28

Uso de células derivadas de la placenta en el tratamiento de la retinitis pigmentosa

En la actualidad no existe un tratamiento real para los trastornos que producen ceguera derivados de la degeneración de las células de la retina. La pérdida de fotorreceptores como resultado de la apoptosis o la degeneración secundaria conduce a un deterioro progresivo de la visión, y en última instancia, a la ceguera. Las enfermedades en las que ocurre esto incluyen la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y la retinitis pigmentosa (RP). La RP está asociada más comúnmente con una sola mutación génica, lo que contribuye a la muerte celular de los fotorreceptores.

Los fotorreceptores retinianos y el epitelio pigmentario retiniano adyacente forman una unidad funcional. La rata Royal College of Surgeons (RCS) presenta un defecto de la quinasa receptora de tirosina (Merkt) que afecta a la fagocitosis del segmento externo, lo que conduce a la muerte de las células fotorreceptoras (D'Cruz *et al.* (2000) Hum. Mol. Genet. 9(4):645-51).

Se descubrió que el trasplante de células del epitelio pigmentario retiniano (RPE) en el espacio subretiniano de ratas RCS limitaba el avance de la pérdida de fotorreceptores y conservaba la función visual (Li y Turner (1988) Exp Eye Res. 47(6):911-7). En este ejemplo, se demuestra que las células derivadas de la placenta pueden utilizarse para promover el rescate de los fotorreceptores en un modelo RCS.

Métodos y materiales

Trasplantes de células. Se expandieron cultivos de células de la placenta y fibroblastos adultos humanos (pase 10) durante 1 pase. Todas las células se sembraron inicialmente a razón de 5.000 células/cm² en matraces T75 recubiertos con gelatina en medio de crecimiento ((DMEM: bajo contenido de glucosa (Invitrogen, Carlsbad, CA), suero bovino definido al 15% (v/v) (Hyclone, Logan, UT; lote n° AND18475), 2-mercaptoetanol al 0,001% (Sigma, St. Louis, MO), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin, 0,25 microgramos por mililitro de anfotericina B; Invitrogen, Carlsbad, CA). Para pases posteriores, todas las células se trataron de la siguiente manera. Después de la tripsinización, se realizó el recuento de las células viables después de la tinción con azul de tripano. En resumen, se combinaron 50 microlitros de suspensión de células con 50 microlitros de azul de tripano al 0,04% p/v (Sigma, St. Louis MO) y se estimó el número de células viables con un hemocitómetro. Las células se tripsinizaron y se lavaron tres veces en medio DMEM con bajo contenido de glucosa y sin complemento (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los cultivos de células de la placenta y fibroblastos humanos en pase 11 se tripsinizaron y se lavaron dos veces en medio L-15 de Leibovitz (Invitrogen, Carlsbad, CA). Para el procedimiento de trasplante, se anestesió a ratas RCS distróficas con xilazina-ketamina (1 miligramo/kilogramo intraperitoneal (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 mililitro de agua destilada) y se les sujetaron las cabezas con un gancho nasal. Se resuspendieron células desprovistas de suero (2×10^5 células por inyección) en 2 microlitros de medio L-15 de Leibovitz (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se trasplantaron utilizando una pipeta fina de vidrio (diámetro interno de 75 a 150 microlitros) por vía trans-escleral. Las células se introdujeron en el espacio subretiniano dorso-temporal de ratas RCS pigmentadas-distróficas, de 3 semanas de edad, anestesiadas (N total = 10/tipo de célula).

Las células se inyectaron unilateralmente en el ojo derecho, mientras que en el ojo izquierdo se inyectó medio transportador en solitario (control con simulación; medio L-15 de Leibovitz). La viabilidad de las células de trasplante residuales se mantuvo en más de un 95% como se evaluó mediante exclusión con azul de tripano al final de la sesión de trasplante. Después de realizarse las inyecciones de células, se inyectó a los animales dexametasona (2 miligramos/kilogramo) durante 10 días después del trasplante. Durante el tiempo que duró el estudio, los animales se mantuvieron con ciclosporina A oral (210 mg/litro de agua potable; dando como resultado una concentración en sangre: 250-300 microgramos/litro) (Bedford Labs, Bedford, Ohio) desde 2 días antes del trasplante hasta el final del estudio. La comida y el agua estaban disponibles a discreción. Se sacrificó a los animales a los 60 ó 90 días después de la operación, siendo sacrificados algunos animales en instantes de tiempo anteriores para la evaluación histológica de los cambios a corto plazo asociados con el trasplante de células.

Registros de ERG. Después de adaptarse a la oscuridad durante la noche, se preparó a los animales para el registro de ERG bajo luz roja tenue, como se ha descrito anteriormente (Sauve *et al.* (2004) *Vision Res.* enero; 44(1):9-18). En resumen, bajo anestesia (con una mezcla de 150 miligramos/kilogramo i.p. de ketamina y 10 miligramos/kilogramo i.p. de xilazina), se sujetó la cabeza con un soporte estereotáxico para cabeza y se controló la temperatura corporal mediante un termómetro rectal y se mantuvo a 38°C utilizando una manta homeotérmica. Se dilataron las pupilas utilizando partes iguales de fenilefrina tópica al 2,5% y tropicamida al 1%. Se utilizó anestesia tópica con bupivacaína al 0,75% para prevenir cualquier reflejo de la córnea y se aplicó con frecuencia en la córnea una gota de solución salina al 0,9% para evitar su deshidratación y permitir el contacto eléctrico con el electrodo de registro (asa de oro). Una aguja de calibre 25 insertada debajo del cuero cabelludo, entre los ojos, hacía de electrodo de referencia. La amplificación (a pasa banda de 1 Hz-1.000 Hz, sin filtrado rechaza banda), la presentación del estímulo y la adquisición de datos fueron proporcionados por el sistema UTAS-3000 de LKC Technologies (Gaithersburg, MD). Los ERG se registraron a los 60 días.

Registro de ondas a y b mixtas. Para la cuantificación de las ondas b adaptadas a la oscuridad, los registros consistieron en presentaciones de un solo flash (10 microsegundos de duración), repetidos de 3 a 5 veces para verificar la fiabilidad de la respuesta y mejorar la relación señal-ruido, de ser necesario. Los estímulos se presentaron a seis intensidades crecientes en etapas de una unidad log que variaban de -3,6 a 1,4 log candela/m² de luminancia. Para minimizar la posible decoloración de los bastones, se aumentaron los intervalos entre estímulos a medida que la luminancia del estímulo se elevaba desde 10 segundos a la intensidad del estímulo más baja hasta 2 minutos a la intensidad del estímulo más alta. La amplitud máxima de la onda b se definió como la obtenida a partir de la serie de intensidades del flash, independientemente de la intensidad del estímulo. No se utilizó la verdadera V_{max} del ajuste de los datos con una curva de Naka-Rushton ya que las respuestas de ERG fueron con frecuencia irregulares a niveles de luminancia más altos en los animales distróficos y mostraron tendencia a respuestas deprimidas a aproximadamente 0,4 y 1,4 log candela/m². Con el fin de determinar la edad a la que se obtuvieron o perdieron los componentes del ERG, se utilizaron amplitudes según los criterios: 20 microvoltios para las ondas a y b, y 10 microvoltios para las respuestas tipo STR. La amplitud de la onda b se midió desde el pico negativo de la onda a hasta el vértice positivo de la onda b, y no hasta el pico de las oscilaciones, que puede superar el vértice de la onda b (Nusinowitz *et al.* (1999) *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40(12):2848-58).

Aislamiento de las respuestas de conos y bastones. Se utilizó el protocolo de doble flash para determinar el aislamiento de las respuestas de conos y bastones (Nixon *et al.* (2001) *Clin. Experiment Ophthalmol.* 29(3): 193-6). Se presentó un flash de sondeo 1 segundo después de un flash de condicionamiento, utilizando una característica específica del sistema UTAS-3000 (LKC Technologies) con Ganzfeld calibrada; asegurando la recarga completa del estimulador en las condiciones utilizadas. El papel del flash de condicionamiento en el procedimiento era saturar de manera transitoria los bastones para que se hicieran insensibles al flash de sondeo. La respuesta al flash de sondeo se tomó como un reflejo de la actividad inducida por los conos. Se obtuvo una onda b inducida por los bastones restando la respuesta inducida por los conos a partir de la respuesta mixta (obtenida después de la presentación de un flash de sondeo solo, es decir, no precedido por ningún flash de condicionamiento).

Histología. Se sacrificó a los animales 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 practicar una incisión en la córnea, se fijaron los ojos con paraformaldehído al 2,5%, glutaraldehído al 2,5%, ácido pícrico al 0,01% en tampón cacodilato 0,1 M (pH 7,4). Después de la fijación, se extrajeron la córnea y el cristalino mediante corte alrededor del cuerpo ciliar. Se practicó una pequeña incisión en la periferia de la retina dorsal antes de quitar el recto superior para ayudar a mantener la orientación. A continuación, se fijaron posteriormente las retinas en tetróxido de osmio al 1% durante 1 hora. Después de la deshidratación a través de varios alcoholes a epoxipropano, las retinas se incluyeron en resina de inclusión TAAB (TAAB Laboratories, Alderminster, UK). Se tiñeron secciones semifinas con azul de toluidina al 1% en tampón de borato al 1% y las secciones ultrafinas se sometieron a contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo.

Para la tinción de Nissl, las secciones se tiñeron con violeta de cresilo al 0,75% (Sigma, St. Louis, MO) después de lo cual se deshidrataron mediante alcoholes de graduación descendente al 70%, 95% y 100%, dos veces. A continuación se colocaron en xileno (Sigma, St. Louis, MO), se aclararon con PBS (pH 7,4) (Invitrogen, Carlsbad, CA), se cubrieron con un cubreobjetos y se montaron con medio de montaje DPX (Sigma, St. Louis, MO).

Resultados

Registros de ERG. A los 60 días después del trasplante, los animales que recibieron inyecciones de células derivadas de la placenta (n = 4) no mostraron ninguna mejora en una onda a (20 ± 20) frente a los controles con simulación (0), pero mostraron una mejora en la onda b mixta (81 ± 72) frente a los controles con simulación (1,5 ± 2), y una buena mejora en la onda b de los conos (50 ± 19) frente a los controles con simulación (7 ± 7), y en la contribución de los bastones (30%) frente a los controles con simulación (0). Estos resultados indicaban una mejora en la capacidad de respuesta visual en comparación con los controles con simulación. A diferencia del trasplante de células derivadas de la placenta, los trasplantes de fibroblastos no mostraron ninguna mejora en ninguno de los parámetros ensayados.

Tabla 28-1: datos de ERG

Grupo	Onda a		Onda b mixta		Onda b de conos		% de contribución de bastones	
	No tratados	Tratados	No tratados	Tratados	No tratados	Tratados	No tratados	Tratados
5 Con simulación 60 días	0	0	7 ± 9	0	23 ± 5	12 ± 16	N/A	N/A
10 P (n=4) 60 días	0	20 ± 20	1,5 ± 2	81 ± 72	7 ± 7	50 ± 19	N/A	30
N.B. Con simulación = control (medio solamente), P = trasplante de células placentarias								

15 **Histología.** Después del trasplante, no hubo pruebas histológicas de una reacción inflamatoria, ni se observó infiltración de células inmunitarias en las secciones teñidas con Nissl en los grupos de células placentarias. Sin embargo, las implantaciones de fibroblastos dieron como resultado la muerte de los animales (n = 7) e indicios de respuestas inflamatorias en etapas tempranas.

20 Referencias

Lund *et al.* (2001) Proc Natl Acad Sci U.S.A. 98(17):9942-7.

25 EJEMPLO 29

Potencial condrogénico de las células derivadas posparto al implantarse en ratones SCID

Se evaluó el potencial condrogénico de las células derivadas de tejido de cordón umbilical o de la placenta después de la siembra en armazones biorreabsorbibles cargados con factor de crecimiento y su implantación en ratones SCID.

30 Materiales y métodos

35 **Reactivos.** Se obtuvieron medio esencial modificado de Dulbecco (DMEM), penicilina y estreptomycin de Invitrogen, Carlsbad, CA. Se obtuvo suero de ternera fetal (FCS) de Hyclone (Logan, UT). Se obtuvo medio Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (MSCGM) de Biowhittaker, Walkersville, MD. Se obtuvo TGFbeta-3 de Oncogene Research Products, San Diego, CA. Se obtuvo GDF-5 de Biopharm, Heidelberg, Alemania (publicación PCT internacional N° WO96/01316 A1, patente de Estados Unidos N° 5.994.094A). El medio de crecimiento de condrocitos comprendía DMEM con alto contenido de glucosa complementado con suero de ternera fetal al 10% (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.

45 **Células.** Se obtuvieron células madre mesenquimales humanas (hMSC, lote n° 2F1656) de Biowhittaker, Walkersville, MD y se cultivaron en MSCGM según las instrucciones del fabricante. Este lote se ensayó previamente en el laboratorio en experimentos *in vitro* y demostró ser positivo en los ensayos de condrogénesis. Se obtuvieron fibroblastos humanos adultos de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Manassas, VA y se cultivaron en Medio de crecimiento en matraces de plástico de cultivo tisular recubiertos con gelatina. Se prepararon células derivadas posparto aisladas de cordones umbilicales humanos (lote n° 022703Umb) y placenta (lote n° 071003Plac) como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 1). Las células se cultivaron en Medio de crecimiento en matraces de plástico de cultivo tisular recubiertos con gelatina. Los cultivos celulares se incubaron en condiciones de crecimiento normales. Las células utilizadas para los experimentos se encontraban en los pases 5 y 14.

55 **Armazones.** Se obtuvieron armazones de espuma de ácido poliglicólico (PGA)/policaprolactona (PCL) 65/35 [4x5 centímetros, 1 milímetro de espesor, esterilizados con óxido de etileno (ETO)] reforzados con malla de polidioxanona (PDS) (espuma de PGA/PCL-malla de PDS) del Center for Biomaterials and Advanced Technologies (CBAT, Somerville, NJ). Se cargaron recortes ("punches") (3,5 milímetros) hechos a partir de los armazones con GDF-5 (3,4 microgramos/armazón), TGFbeta-3 (10 nanogramos/armazón), una combinación de GDF-5 y TGFbeta-3, o medio de control, y se liofilizaron.

60 **Siembra de células en los armazones.** Se tripsinizaron células derivadas de la placenta y de cordón umbilical, y se determinó el número de células y su viabilidad. Se resuspendieron $0,75 \times 10^6$ células en 15 microlitros de Medio de crecimiento y se sembraron sobre los recortes de armazón de 3,5 milímetros en una placa de cultivo celular. El armazón sembrado con las células se incubó en una incubadora de cultivo celular en atmósfera normal con CO₂ al 5% a 37°C durante 2 horas, tras lo cual se colocan dentro de anillos de explante de cartílago.

Explantos de cartílago bovino. Se generaron explantes de cartílago de 5 milímetros de diámetro a partir de cartílago obtenido de la espaldilla de un bovino joven. Se extirparon recortes (3 milímetros) del centro del explante y se reemplazaron con un armazón reabsorbible de 3,5 milímetros sembrado con las células. Los armazones con células se mantuvieron dentro de los explantes mediante adhesivo 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.

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

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

Implantación de SCID.

A. Pesos corporales

Se pesó cada animal antes de ser anestesiado y en el momento de la necropsia.

B. Anestesia y preparación quirúrgica:

Todas las manipulaciones de los ratones SCID tuvieron lugar 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.

Después de inducir la anestesia, se cortó el pelo de toda la parte posterior del animal desde la zona cervical dorsal hasta la zona lumbosacra dorsal con una esquiladora eléctrica. Se limpió la zona con diacetato de clorhexidina, se aclaró con alcohol, se secó y se untó con una solución acuosa de yodóforo del 1% de yodo disponible. Se aplicó a los ojos una pomada oftálmica para evitar que se secase el tejido durante el período de anestesia. El animal anestesiado y preparado quirúrgicamente se colocó en el decúbito deseado.

C. Técnica de implantación subcutánea:

Se practicó una incisión cutánea de aproximadamente 2 cm justo lateral a la columna torácica paralela a la columna vertebral. La piel se separó del tejido conectivo subyacente mediante disección roma. Cada ratón SCID recibió 2 tratamientos que se colocaron en bolsillos subcutáneos creados mediante disección roma en cada hemitórax a través de una incisión cutánea. Se utilizaron suturas temporales de ETHIBOND EXCEL 5-0 (poliéster) para unir temporalmente la piel a la musculatura alrededor de cada armazón para evitar la migración subcutánea. Los armazones se implantaron durante 6 semanas y, a continuación, se recogieron. El diseño experimental se esboza en la Tabla 29-1.

Tabla 29-1. Diseño experimental: Tratamiento (N = 3 por tratamiento)

- A. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con células derivadas de la placenta, EP, TGFbeta3
- B. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con células derivadas de la placenta, EP, rhGDF-5
- C. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con células derivadas de la placenta, EP, rhGDF-5+TGFbeta3
- D. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con células derivadas de la placenta, EP, control
- E. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con células derivadas de la placenta, LP, TGFbeta3
- F. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con células derivadas de la placenta, LP, rhGDF-5
- G. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con células derivadas de la placenta, LP, rhGDF-5+TGFbeta3
- H. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con células derivadas de la placenta, LP, control
- I. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con células derivadas de cordón umbilical, EP, TGFbeta3
- J. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con células derivadas de cordón umbilical, EP, rhGDF-5
- K. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con células derivadas de cordón umbilical, EP, rhGDF-5+TGFbeta3
- L. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con células derivadas de cordón umbilical, EP, control
- M. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con células derivadas de cordón umbilical, LP, TGFbeta3

- N. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con células derivadas de cordón umbilical, LP, rhGDF-5
 O. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con células derivadas de cordón umbilical, LP, rhGDF-5+TGFbeta3
 5 P. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con células derivadas de cordón umbilical, LP, control
 Q. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con hMSC, TGFbeta3
 R. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con hMSC, rhGDF-5
 S. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con hMSC, rhGDF-5+TGFbeta3
 T. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con hMSC, control
 10 U. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con fibroblastos, Adulto, TGFbeta3
 V. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con fibroblastos, Adulto, rhGDF-5
 W. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con fibroblastos, Adulto, rhGDF-5+TGFbeta
 X. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con fibroblastos, Adulto, control
 Y. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS, TGFbeta3
 Z. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS, rhGDF-5
 15 AA. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS, rhGDF-5+TGFbeta3
 BB. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS, control

D. Necropsia y preparación histológica

- 20 Se realizó un examen macroscópico en todos los animales que murieron durante el estudio o que se sacrificaron en estado moribundo. Los tejidos seleccionados se guardaron a criterio del patólogo y/o del director del estudio.
- 25 Se sacrificó a los ratones por inhalación de CO₂ en sus intervalos establecidos. Se registraron las observaciones macroscópicas de los sitios implantados. Se extirparon las muestras de los sitios de implantación subcutánea con su piel suprayacente y se fijaron en formalina tamponada al 10%. Cada implante se dividió en dos mitades, y una mitad se envió al MPI Research (Mattawan, MI) para la inclusión en parafina, el corte y la tinción con hematoxilina y eosina (H&E) y safranina O (SO).
- 30 Los datos obtenidos de este estudio no se analizaron estadísticamente.

Resultados

- 35 Se observó formación de nuevo cartílago y hueso en la mayoría de las muestras, incluidos los armazones sembrados con células cargados con factor de crecimiento, los armazones de control sembrados con células, y los armazones cargados con factor de crecimiento solo. El grado de formación de nuevo cartílago y hueso varió dentro de los grupos de tratamiento y control.
- 40 Los armazones sembrados con células derivadas de la placenta en pase temprano y tardío presentaron formación de nuevo cartílago y hueso dentro de los armazones. No se observaron diferencias obvias en la formación de nuevo cartílago y hueso entre los diferentes armazones sembrados con células cargados con factor de crecimiento y los armazones sembrados con células solas. En comparación con los armazones de control (sin factores de crecimiento y sin células), parecía que había un mayor grado de formación de nuevo cartílago en los armazones sembrados con células con y sin factores de crecimiento, y en los armazones cargados con factor de crecimiento solo. La formación de nuevo cartílago con los armazones sembrados con células derivadas de la placenta fue similar a los armazones sembrados con MSC y los sembrados con fibroblastos.
- 45
- 50 En los armazones tratados con factor de crecimiento y de control sembrados con células derivadas de cordón umbilical en pases temprano y tardío, se observó formación de nuevo cartílago y hueso. El grado de formación de cartílago parecía ser menor que el observado con las células derivadas de la placenta. Ninguna muestra presentó formación extensa de cartílago como se observaba con las células derivadas de la placenta. La formación de hueso parecía ser mayor en los armazones sembrados con células derivadas de cordón umbilical que en los armazones que contenían TGFbeta-3 y rhGDF-5.
- 55 Los armazones cargados con hMSC también presentaron formación de nuevo cartílago y hueso. El grado de formación de nuevo cartílago y hueso fue similar para todos los grupos de tratamiento con hMSC. Los armazones sembrados con fibroblastos humanos adultos también demostraron formación de nuevo cartílago y hueso. Los resultados fueron similares a los obtenidos con las células derivadas de la placenta y las hMSC.
- 60 En el grupo de control, en el que los armazones cargados con factor de crecimiento o el armazón solo se colocaron en anillos de cartílago y se implantaron, también se observó formación de nuevo cartílago y hueso. No es de extrañar que el grado de formación de nuevo cartílago fuese mayor en los armazones con factor de crecimiento que en los armazones sin factor de crecimiento. Hubo aumento de la formación de hueso en el control con la combinación de los dos factores de crecimiento ensayados.
- 65

Se observó formación de nuevo cartílago adyacente a los anillos de explante de cartílago, así como dentro de los armazones. La formación de nuevo cartílago dentro de los armazones adyacentes a los anillos de cartílago podría ser el resultado de la migración de condrocitos. La formación de cartílago observada como islas dentro de los armazones puede ser el resultado de la migración de condrocitos dentro de los armazones, de la diferenciación de las células sembradas o de la diferenciación de células progenitoras de ratón endógenas. Esta observación se deriva del hecho de que en los armazones cargados con factor de crecimiento de control sin células sembradas, se observaron islas de diferenciación condrogénica. Se observó formación de nuevo hueso dentro de los armazones de forma independiente y también asociada con condrocitos. La formación de hueso puede haber surgido de la diferenciación de osteoblastos, así como de la osificación endocondral.

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

Se observó abundancia de nuevos vasos sanguíneos con los armazones cargados con células derivadas de la placenta y células derivadas de cordón umbilical. Los vasos sanguíneos fueron abundantes en las zonas de formación de hueso. También se observaron nuevos vasos sanguíneos en los armazones sembrados con hMSC y sembrados con fibroblastos asociados con la formación de nuevo hueso.

No pueden descartarse los efectos sistémicos del almacén adyacente (con factor de crecimiento (GF)) sobre los armazones de control (sin GF, sin células) en la promoción de la formación de nuevo cartílago y hueso. El análisis de la formación de nuevo cartílago y hueso en los armazones, tomando en consideración los armazones implantados adyacentes a la misma en ratones SCID, no presentó ningún patrón claro de efecto sistémico del factor de crecimiento del almacén adyacente.

Resumen. Los resultados demostraron que se observaba formación de nuevo cartílago y hueso en los armazones con factor de crecimiento y de control sembrados con células derivadas de la placenta y de cordón umbilical. Los resultados con células derivadas de la placenta fueron similares a los observados con células madre mesenquimales humanas, mientras que el grado de formación de nuevo tejido tipo cartílago fue ligeramente menos pronunciado en las células derivadas de cordón umbilical. Los armazones cargados con factor de crecimiento implantados sin células también demostraron formación de nuevo cartílago y hueso. Estos datos indican que la formación de nuevo cartílago dentro de los armazones puede surgir a partir de condrocitos que migraron desde los explantes bovinos, a partir de la diferenciación condrogénica de células progenitoras endógenas, y a partir de la diferenciación condrogénica de las células sembradas.

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

EJEMPLO 30

Uso de células derivadas posparto en la reparación del nervios

Se han utilizado ampliamente las lesiones de células ganglionares retinianas (RGC) como modelos para diversas estrategias de reparación en el SNC de mamíferos adultos. Se ha demostrado que la sección retrobulbar de axones de RGC de roedores adultos da como resultado el fracaso de la ramificación axonal (Zeng *et al.*, 1995) y la muerte progresiva de la población de células parentales (Villegas-Perez *et al.*, 1993). Numerosos estudios han demostrado los efectos estimuladores de diversos factores exógenos y endógenos sobre la supervivencia de las RGC axotomizadas y la regeneración de sus axones (Yip y So, 2000; Fischer *et al.*, 2001). Además, otros estudios han demostrado que pueden utilizarse trasplantes de células para estimular la regeneración de los axones de nervios seccionados (Li *et al.*, 2003; Ramon-Cueto *et al.*, 2000). Por lo tanto, estos y otros estudios han demostrado que puede utilizarse la terapia celular para tratar trastornos neurales que afectan a la médula espinal, los nervios periféricos, los nervios pudendos, los nervios ópticos u otras enfermedades/traumatismos debidos a una lesión en la que puede producirse daño nervioso.

Se han desarrollado péptidos de autoensamblaje (PuraMatrix™, patentes de EE.UU. nº 5.670.483, 5.955.343, solicitud publicada de EE.UU. nº 2002/0160471, publicación de patente internacional nº WO 02/062969) para servir de almacén para la fijación celular para encapsular células en 3-D, sembrar células en recubrimientos 2-D, o como microtransportadores en cultivos en suspensión. El cultivo celular tridimensional ha requerido materiales derivados de animales (extracto del sarcoma de ratón), con sus problemas intrínsecos de reproducibilidad y señalización celular, o armazones sintéticos mucho mayores, que no logran aproximarse a la escala física del nanómetro ni a los atributos químicos de la ECM natural. RAD 16 (NH₂-RADARADARADA-COOH) y KLD (NH₂-

KLDLKLKLDL-COOH) se sintetizan en pequeños fragmentos de oligopéptidos (RAD16 es de 5 nanómetros) que se autoensamblan para formar nanofibras en una escala similar a la matriz extracelular (ECM) *in vivo* (3D Matrix, Inc Cambridge, MA). El autoensamblaje es iniciado por cationes monovalentes o divalentes que se encuentran en los medios de cultivo o en el entorno fisiológico. En los protocolos descritos en este ejemplo, se utilizó RAD 16 como microtransportador para implantar células posparto en el defecto ocular. En este ejemplo, se demuestra que los trasplantes de células derivadas posparto (PPDC) pueden resultar eficaces en un modelo de regeneración axonal de nervio óptico de rata adulta.

Métodos y materiales

Células. Se expandieron cultivos de células PPDC y fibroblastos adultos humanos (pase 10) durante 1 pase. Todas las células se sembraron inicialmente a razón de 5.000 células/cm² en matraces T75 recubiertos con gelatina en Medio de crecimiento (DMEM: bajo contenido de glucosa (Invitrogen, Carlsbad, CA), suero bovino definido al 15% (v/v) (Hyclone, Logan, UT; lote nº AND18475), 2-mercaptoetanol al 0,001% (Sigma, St. Louis, MO), 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomina, 0,25 microgramos por mililitro de anfotericina B; Invitrogen, Carlsbad, CA). En el pase 11 las células se tripsinizaron y se determinó la viabilidad mediante tinción de azul de tripano. En resumen, se combinaron 50 microlitros de suspensión de células con 50 microlitros de azul de tripano al 0,04% p/v (Sigma, St. Louis MO) y se estimó el número de células viables con un hemocitómetro. A continuación, las células se lavaron tres veces en medio L-15 de Leibovitz sin complemento (Invitrogen, Carlsbad, CA). A continuación, las células se suspendieron a una concentración de 200.000 células en 25 microlitros de RAD-16 (3DM Inc., Cambridge, MA) que se tamponó y se hizo isotónico según las recomendaciones del fabricante. Se añadieron cien microlitros de medio L-15 de Leibovitz sin complemento sobre la suspensión de células/matriz para mantenerla húmeda hasta su uso. Estos cultivos de células/matriz se mantuvieron en condiciones atmosféricas normales hasta que se trasplantaron. En el momento del trasplante, se eliminó el exceso de medio.

Animales y cirugía. Se utilizaron ratas Long Evans hembras (220 g-240 g de peso corporal). Bajo anestesia con tribromoetanol intraperitoneal (20 miligramos/100 gramos de peso corporal), se expuso el nervio óptico, y se practicó una incisión intraorbital en la vaina del nervio óptico a aproximadamente 2 milímetros de la papila óptica, se levantó el nervio de la vaina para permitir la transección completa con unas tijeras finas (Li *et al.*, 2003). La completitud de la transección se confirmó mediante observación visual de la separación completa de los muñones proximal y distal. El grupo de control consistió en ratas lesionadas sin trasplantes. En las ratas con trasplante se insertaron células posparto cultivadas sembradas en RAD-16 entre los muñones proximal y distal utilizando un par de microfórceps. Se implantaron aproximadamente 75.000 células en RAD-16 en el nervio óptico cortado. Se realizó un frotis de células/matriz en el trozo cortado con un par de microfórceps finos. La vaina del nervio óptico cortado se cerró con nylon monofilamento negro 10/0 (ETHICON, Edimburgo, Reino Unido). Por lo tanto, la separación se cerró aproximando entre sí los extremos cortados proximal y distal del nervio.

Después de realizar las inyecciones de células, se inyectó a los animales dexametasona (2 miligramos/kilogramo) durante 10 días después del trasplante. Durante el tiempo que duró el estudio, los animales se mantuvieron con ciclosporina A oral (210 miligramos/litro de agua potable; dando como resultado una concentración en sangre: 250-300 microgramos/litro) (Bedford Labs, Bedford, Ohio) desde 2 días antes del trasplante hasta el final del estudio. La comida y el agua estaban disponibles a discreción. Se sacrificó a los animales a los 30 ó 60 días después del trasplante.

Aplicación de CTB. Tres días antes de sacrificar a los animales, bajo anestesia, se insertó tangencialmente a través de la esclerótica, detrás de la cristalino, una micropipeta de vidrio con una punta de 30-50 milímetros, y se inyectaron dos alícuotas de 4-5 microlitros de una solución acuosa al 1% del trazador retrógrado toxina del cólera B (CTB) (List Biologic, Campbell, CA) en el humor vítreo. Se sometió a los animales a perfusión con fijador y se recogieron los nervios ópticos en el mismo fijador durante 1 hora. Los nervios ópticos se transfirieron a sacarosa durante la noche. Se incubaron secciones de criostato de veinte micrómetros en glicina 0,1 molar durante 30 minutos y se bloquearon en una solución de PBS que contenía albúmina de suero bovino (BSA) al 2,5% (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania) y Triton X-100 al 0,5% (Sigma, St. Louis, MO), seguido de una solución que contenía anticuerpos de cabra contra CTB (List Biologic, Campbell, CA) diluidos 1:4.000 en un suero de conejo normal (NRS) al 2% que contenía PBS (Invitrogen, Carlsbad, CA), BSA al 2,5% y Triton X-100 al 2% (Sigma, St. Louis, MO) en PBS, y se incubaron en anticuerpo IgG de conejo contra cabra biotinilado (Vector Laboratories, Burlingame, CA) diluido 1:200 en Triton-X100 al 2% en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente. Seguidamente se sometió a tinción en 1:200 de estreptavidina-verde (Alexa Flour 438; Molecular Probes, Eugene, OR) en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, las secciones teñidas se lavaron en PBS y se realizó una tinción de contraste con yoduro de propidio para la microscopía confocal.

Preparación de la histología. En resumen, 5 días después de la inyección de CTB, se sometió a las ratas a perfusión con paraformaldehído al 4%. Se dio a las ratas 4 centímetros cúbicos de uretano y, a continuación, se sometieron a perfusión con PBS (0,1 molar), a continuación con paraformaldehído al 4%. Se cortó la médula espinal y se extrajo el hueso de la cabeza para exponer el colículo. A continuación, se extrajo el colículo y se colocó en paraformaldehído al 4%. El ojo se extrajo mediante corte alrededor de la parte exterior del ojo y llegando todo lo

atrás posible. Se tuvo cuidado de no cortar el nervio óptico que se encuentra en la parte inferior del ojo. Se extrajo el ojo y se cortaron los músculos, exponiendo el nervio óptico que, a continuación, se colocó en paraformaldehído al 4%.

5 **Resultados**

10 **Solamente lesiones.** Un mes después de la sección retrotubular del nervio óptico, se identificaron varios axones marcados con CTB en el segmento de nervio fijado a la retina. En los 200 micrómetros más cercanos al corte, se observó que los axones emitían varias ramas colaterales en ángulo recto respecto al eje principal y terminaban como un ovillo neuromatoso en la superficie cortada. En este corte entre los muñones proximal y distal, se observó que la separación se unía progresivamente mediante un segmento de 2-3 milímetros de tejido conectivo vascularizado; sin embargo, no se observó que los axones avanzaran en esta zona unida. Por lo tanto, en los animales que recibieron solamente lesiones no se observó crecimiento axonal que alcanzase el muñón distal.

15 **Trasplante de RAD-16.** Tras el trasplante de RAD-16 en el corte, se observó increscencia evidente de tejido conectivo vascularizado. Sin embargo, no se observó crecimiento axonal entre los muñones proximal y distal. Los resultados demuestran que la aplicación de RAD-16 solo no es suficiente para inducir la regeneración axonal en esta situación.

20 **Trasplante de células derivadas posparto.** El trasplante de células derivadas posparto en el nervio óptico cortado estimulaba la regeneración del nervio óptico. También se observó cierta regeneración en las condiciones en las que se implantaron fibroblastos, aunque esta fue mínima en comparación con la regeneración observada con las células derivadas de la placenta trasplantadas. Se observó regeneración del nervio óptico en 4/5 animales a los que se les trasplantaron células derivadas de la placenta, 3/6 animales a los que se les trasplantaron fibroblastos dérmicos adultos, y en 1/4 animales a los que se les trasplantaron células derivadas de cordón umbilical. En situaciones en las que se observó regeneración, el marcado con CTB confirmó la regeneración de los axones de las células ganglionares retinianas, que se demostró penetraban a través de la zona del trasplante. También se realizó el marcado con GFAP para determinar el nivel de la cicatrización glial. La expresión de GFAP se intensificó en el muñón proximal, observándose cierta inmunotinción por el injerto reinervado.

30 **Resumen.** Estos resultados demuestran que las células derivadas posparto adultas humanas trasplantadas son capaces de estimular y guiar la regeneración de los axones de las células ganglionares retinianas cortados.

35 **Referencias**

- 1) Zeng BY, Anderson PN, Campbell G, Lieberman AR. 1995. J. Anat.186:495-508.
 2) Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Bray GM, Aguayo AJ. 1988. J Neurosci.8:265-80.
 3) Yip HK, So KF. 2000. Prog Retin Eye Res. 19: 559-75.
 4) Fischer D, Heiduschka P, Thanos S. 2001. Exp Neurol. 172: 257-72.
 40 5) Ramon-Cueto A, Cordero MI, Santos-Benito FF, Avila J. 2000. Neuron 25: 425-35.

45 Aunque la presente invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencia a las formas de realización actualmente preferentes, se entiende que la invención no se limita a las formas de realización específicamente descritas y ejemplificadas en el presente documento. Pueden realizarse numerosos cambios y modificaciones en la forma realización preferente de la invención, y tales cambios y modificaciones pueden realizarse sin alejarse del alcance de la invención como se establece en las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 50 <110> Ethicon, Incorporated
- <120> CÉLULAS POSPARTO DERIVADAS DE TEJIDO PLACENTARIO Y MÉTODOS DE PREPARACIÓN Y USO DE LAS MISMAS
- 55 <130> P055844EP
- <150> PCT/US2004/020816
 <151> 25-06-2004
- 60 <150> US 60/483.264
 <151> 27-06-2003
- <160> 16
- 65 <170> PatentIn versión 3.3

5 <210> 1
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

10 <400> 1
 gagaaatcca aagagcaaat gg 22

15 <210> 2
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Constructo sintético

<400> 2
 agaatgaaa actggaatag g 21

25 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Constructo sintético

<400> 3
 tctcgatgc ttcggattcc 20

35 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Constructo sintético

45 <400> 4
 gaattctcg aatctctgtt g 21

50 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

55 <400> 5
 ttacaagcag tgcagaaaac c 21

60 <210> 6
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

65 <400> 6
 agtaaacatt gaaaccacag cc 22

ES 2 569 780 T3

5 <210> 7
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

10 <400> 7
tctgcagctc tgtgtgaagg 20

15 <210> 8
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

20 <400> 8
ctcaaaaac ttctccaca cc 22

25 <210> 9
<211> 17
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

30 <400> 9
cccacgccac gctctcc 17

35 <210> 10
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

40 <400> 10
tctgtcagt tgggtctcc 19

45 <210> 11
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

50 <400> 11
ctggattggc gttgttg 20

55 <210> 12
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

60 <400> 12
tccaagggtg gagtgctgta g 21

65

5 <210> 13
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

10 <400> 13
ctgttgcgca catccctgcc c 21

15 <210> 14
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

20 <400> 14
ggcagtctgg cttctcaga tt 22

25 <210> 15
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> Constructo sintético

<400> 15
ccctctccct tacccttagc a 21

35 <210> 16
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

40 <220>
<223> Constructo sintético

<400> 16
ctgtgaaagg acctgtctgt cgc 23

45

REIVINDICACIONES

- 5 1. Población homogénea aislada de células derivadas de la placenta humana que pueden obtenerse mediante digestión enzimática con una metaloproteasa de matriz, una proteasa neutra y una enzima mucolítica de placenta humana exenta de sangre, y en la que dicha población de células es capaz de autorrenovación y expansión en cultivo, tiene el potencial de diferenciarse a células de otros fenotipos, y en la que las células:
- 10 (a) producen cada uno de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, detectado mediante citometría de flujo;
 (b) no producen CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 ni HLA-DR,DP,DQ, detectado mediante citometría de flujo;
 y
 (c) secretan la proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP1a).
- 15 2. Población de células según la reivindicación 1, en la que dicha célula es una célula derivada de placenta neonatal.
3. Población de células según la reivindicación 1, en la que dicha célula es una célula derivada de placenta materna.
- 20 4. Población de células según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que dicha célula se obtiene mediante digestión enzimática de placenta humana con colagenasa, dispasa y hialuronidasa.
5. Matriz que comprende la población de células según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
6. Matriz según la reivindicación 5 en la que dicha matriz es un almacén tridimensional.
- 25 7. Matriz según la reivindicación 6 que comprende un almacén no tejido que comprende un copolímero de ácidos glicólico y láctico, una espuma 35/65 PCL/PGA, un gel polimerizable *in situ*, o un hidrogel de péptidos de autoensamblaje.
- 30 8. Composición farmacéutica que comprende la población de células según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
9. Composición farmacéutica según la reivindicación 8, en la que la composición comprende adicionalmente uno o más factores bioactivos seleccionados de entre un factor de crecimiento, un factor inductor de la diferenciación, un factor de supervivencia celular, un antiinflamatorio, o un factor angiogénico.
- 35 10. Composición farmacéutica según la reivindicación 9, en la que el uno o más factores bioactivos es PDGF-bb, EGF, FGF, IGF o LIF.
- 40 11. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en la que la composición comprende la población de células según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en forma de una mezcla con otras células.
12. Población de células según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, matriz según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 o composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en las que la población de células, la matriz o la composición farmacéutica está crioconservada.
- 45 13. Cultivo celular que comprende la población de células según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
14. Kit que comprende la población de células según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un componente adicional seleccionado de entre un almacén, un agente hidratante, un sustrato de cultivo celular, y medios de cultivo celular.
- 50 15. Población de células según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, matriz según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 o cultivo celular según la reivindicación 13 para uso terapéutico.

55

60

65