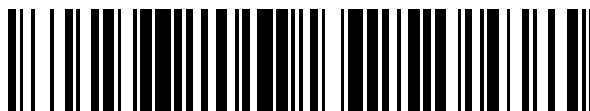


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 577 714**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/0775** (2010.01)

**C12N 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2008 E 08779877 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2016 EP 2173864**

54 Título: **Geles de baja rigidez para la modulación del crecimiento de MSC**

30 Prioridad:

**29.06.2007 US 929487 P**

**29.06.2007 US 929489 P**

**14.09.2007 US 960070 P**

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

**18.07.2016**

73 Titular/es:

**FUNAKI, MAKOTO (100.0%)**

**330 SUMMIT ROAD**

**MEDIA, PA 19063, US**

72 Inventor/es:

**FUNAKI, MAKOTO y**

**WINER, JESSAMINE**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 577 714 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Geles de baja rigidez para la modulación del crecimiento de MSC

5 Campo de la invención

La presente invención proporciona métodos para modular el desarrollo de células madre usando geles blandos. Específicamente, la invención proporciona métodos para modular el desarrollo de células madre, usando geles que tienen propiedades viscoelásticas optimizadas.

10

Antecedentes de la invención

Las células madre mesenquimales adultas tienen la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse en múltiples linajes celulares de tejidos mesenquimales. Por lo tanto, se han tenido en cuenta aplicaciones clínicas de estas células, tales como reemplazo de tejidos dañados o vehículos para agentes antineoplásicos. Las aplicaciones de células madre mesenquimales adultas aún están limitadas a un estadio preclínico en este momento, en parte debido al rápido envejecimiento de estas células *ex vivo*, lo que limita su expansión y modificación técnica. Se ha indicado que la inmortalización de células madre mesenquimales por transducción de telomerasa supera problemas asociados con el envejecimiento acelerado. Sin embargo, su capacidad de autorrenovación ilimitada puede conducir a un crecimiento fuera de control, una vez que se han implantado en tejidos. De hecho, se observó transformación de células madre mesenquimales transducidas con telomerasa en situaciones *in vitro*.

15

20

Por lo tanto, la regulación del crecimiento de células madre mesenquimales adultas es una de las etapas clave para sus aplicaciones clínicas.

25

Zhou *et al*, Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology 23(4), páginas 369-371 (2007) se refiere al efecto de cultivo en suero bajo en la sincronía del ciclo celular de células madre mesenquimales. Las MSC se cultivaron e identificaron con CD44, CD90, CD71 y CD11b por citometría de flujo. Se detectaron el ciclo celular y la apoptosis en cultivo normal y bajo en suero por citómetro de flujo. Se descubrió que el cultivo prolongado en medio con privación de suero indujo detención del ciclo celular en el estadio G0/G1.

30

Sumario de la invención

La presente invención proporciona métodos para modular el desarrollo de células madre usando geles blandos. Específicamente, la invención proporciona métodos para modular el desarrollo de células madre, usando geles que tienen propiedades viscoelásticas optimizadas.

35

En un primer aspecto, la invención proporciona un método para inducir o mantener la inactividad en una célula madre mesenquimal y mantener la capacidad de la célula para reanudar la proliferación e iniciar la diferenciación *ex vivo*, que comprende: poner en contacto la célula madre mesenquimal con un gel o matriz de gel recubierto con una proteína de adhesión que se une con integrina en la membrana de la célula madre mesenquimal, teniendo dicho gel o dicha matriz de gel un módulo de cizalla en un intervalo de 150-750 Pa; y proporcionando a la célula madre mesenquimal material nutriente.

40

45 En una realización, el gel o la matriz de gel es bidimensional o tridimensional.

En una realización, la célula madre mesenquimal se selecciona del grupo que consiste en una célula madre mesenquimal (MSC) derivada de médula ósea, una célula madre renal, una MSC derivada de músculo esquelético, MSC derivada de hueso, una MSC de pulpa dental, una MSC derivada de músculo cardíaco, una MSC derivada de líquido sinovial, una MSC del cordón umbilical y una MSC derivada de tejido adiposo.

50

En una realización, antes de la puesta en contacto, la célula madre mesenquimal no está en un estado inactivo.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un método para inducir la proliferación *ex vivo* en una célula madre mesenquimal, que comprende las etapas de llevar a cabo el método del primer aspecto, poner en contacto la célula madre mesenquimal *ex vivo* con un material inductor de proliferación que comprende un gel o una matriz de gel recubierto con una proteína de adhesión que se une con integrina en la superficie de la célula madre mesenquimal, teniendo el gel o la matriz de gel un módulo de cizalla de 7500 Pa; y proporcionando material de crecimiento de nutrientes para promover la proliferación de la célula madre mesenquimal y su descendencia *ex vivo*.

55

60

En un tercer aspecto, la invención proporciona un método para inducir diferenciación *ex vivo* en una célula madre mesenquimal, que comprende las etapas de: llevar a cabo el método del primer aspecto o llevar a cabo el método del segundo aspecto; poner en contacto la célula madre mesenquimal con un material de diferenciación que comprende estímulos mecánicos y/o químicos seleccionados para estimular la diferenciación de la célula madre mesenquimal a un tipo celular predeterminado; y proporcionar la célula diferenciada con material nutriente de células diferenciadas.

65

En una realización, la célula madre mesenquimal es una célula madre mesenquimal derivada de médula ósea humana, y la célula diferenciada es un osteoblasto, un condrocito, un miocito, un adipocito, una célula de islote beta pancreático, una célula neuronal o una célula de tejido conectivo.

5 En algunas realizaciones:

(a) el gel o la matriz de gel comprende acrilamida y bisacrilamida; y/o

(b) la proteína de adhesión es un colágeno, una fibronectina o una combinación de los mismos.

10 En un cuarto aspecto, la invención proporciona un método para conservar una población de células madre mesenquimales, comprendiendo el método la etapa de cultivar la población de células madre mesenquimales en un gel o una matriz de gel que tiene un módulo de cizalla en un intervalo de 150 Pa a 750 Pa.

15 En una realización, el gel o el gel en la matriz de gel comprende un agente gelificante y una mezcla de acrilamida-bisacrilamida, y el gel o la matriz de gel se recubre con una proteína de adhesión.

En una realización, la proteína de adhesión es un colágeno, una fibronectina o una combinación de los mismos.

20 En algunas realizaciones:

(a) la longitud del telómero de la población de células madre mesenquimales se mantiene; y/o

(b) la población de células madre mesenquimales se mantiene en un estado inactivo; y/o

25 (c) la población de células madre mesenquimales conserva una capacidad para diferenciarse en un tipo celular seleccionado de un adipocito o un osteoblasto; y/o

(d) el gel o la matriz de gel comprende además un suero animal; y/o

30 (e) la etapa de cultivar la población de células madre mesenquimales en un gel o una matriz de gel se precede de una etapa de cultivo de la población de células madre mesenquimales en un aparato de cultivo tisular; y/o

35 (f) la etapa de cultivo se realiza directamente después del aislamiento, la purificación o el enriquecimiento de la población de células madre mesenquimales de una muestra biológica.

En una realización, el método del cuarto aspecto comprende además la etapa de sembrar posteriormente la población de células madre mesenquimales en un aparato de cultivo tisular.

40 Breve descripción de las figuras

Figura 1. A. Propiedades mecánicas de sustratos de poli(acrilamida). Se midió el módulo de cizalla de geles de poli(acrilamida) con un intervalo de proporciones de acrilamida (indicado como porcentajes cerca de las líneas de datos) a bisacrilamida (indicado como agente de reticulación). El módulo de cizalla ( $G'$ ), expresado en Pascales, aumenta a masa polimérica constante con agente de reticulación creciente. El aumento de la concentración de acrilamida del 3 al 12 % también crea un gran intervalo de rigidez de 10 a 50.000 Pa. La línea continua indica la rigidez teórica de una red de tipo gomoso si cada reticulación era elásticamente eficaz. B. Forma de la célula y estructura de F-actina de hMSC en matrices rígidas o blandas. C. Forma de la célula y estructura de F-actina de hMSC en geles blandos y vidrio.

Figura 2. Incorporación de BrdU en hMSC.

Figura 3. El efecto de la rigidez de la matriz en la diferenciación de adipocitos. A. Gráfico de porcentaje de células positivas. Primera barra en cada serie: tinción con Oil Red O. Segunda barra: tinción de PPAR $\gamma$ 2.

Figura 4. Estructura de F-actina en astrocitos sembrados en geles rígidos o blandos.

Figura 5. Cuantificación del aumento de la actividad de Rho de geles blandos a duros. Se sembraron astrocitos en geles de poli(acrilamida) con diversas rigideces. Se cuantificó el nivel de carga de GTP de Rho.

Figura 6. Las células de melanoma se propagan más en matrices rígidas. Representación gráfica de área.

Figura 7. Células de melanoma adheridas a geles blandos y rígidos con la misma eficacia.

Figura 8. Población mayor de células de melanoma en geles rígidos.

La Figura 9 muestra imágenes de MSC humanas en varios sustratos de diferentes elasticidades de acuerdo con diversas realizaciones de la presente invención.

5 La Figura 10 muestra la cantidad de captación de bromodesoxiuridina (BrdU) en MSC humanas en sustratos de diversas elasticidades de acuerdo con diversas realizaciones de la invención.

La Figura 11 muestra (A-D) una ilustración del efecto de un ambiente casi tridimensional en la forma y proliferación de células madre de acuerdo con diversas realizaciones de la invención.

10 La Figura 12 muestra la respuesta de MSC humanas a medio de inducción adipogénico de acuerdo con diversas realizaciones de la invención.

15 La Figura 13 muestra deposición de calcio visualizada con Alizarin Red S después de estimulación de MSC humanas con medio de osteoinducción de acuerdo con diversas realizaciones de la invención.

La Figura 14 muestra un diagrama de flujo para preparar un sistema para inducir inactividad, diferenciación y proliferación en células madre adultas de acuerdo con diversas realizaciones de la invención.

20 La Figura 15 muestra ilustraciones esquemáticas de realizaciones de sistemas de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

25 En el presente documento se describen geles y matrices de geles que tienen una rigidez en el intervalo de 0,01-50 kPa, métodos para fabricarlos y métodos para conservar una población de células madre mesenquimales o estudiar células madre mesenquimales, que los comprenden.

30 En el presente documento también se describe un método para fabricar una matriz de fibrina con una rigidez en un intervalo de 150-750 Pa, que comprende las etapas de polimerizar una composición que comprende una proteína de fibrina o fibrinógeno, produciendo de este modo una matriz de fibrina blanda, en la que la concentración de la proteína de fibrina o fibrinógeno en la matriz de fibrina blanda es de 3-10 mg/ml, y recubrir la matriz de fibrina blanda con una composición que comprende una proteína de adhesión, fabricando de este modo una matriz de fibrina que tiene una rigidez en un intervalo de 150-750 Pa.

35 En el presente documento también se describe un método para inducir inactividad de una célula transformada, que comprende la etapa de cultivar la célula transformada en un gel o matriz de gel de métodos de la presente invención, induciendo de ese modo inactividad de una célula transformada. En otra realización, la célula transformada es una célula cancerosa. En otra realización, la célula transformada es una célula neoplásica. En otra realización, la célula transformada es cualquier otro tipo de célula transformada conocida en la técnica. Cada posibilidad representa una realización distinta.

40 En otra realización de métodos de la presente invención, la longitud de los telómeros de la población de células madre mesenquimales se mantiene. "Mantenerse" se refiere, en otra realización, a una falta de cambio sustancial en la longitud. En otra realización, el término se refiere a una falta de cambio medible en la longitud. En otra realización, el término se refiere a una falta de suficiente cambio en la longitud para afectar a la capacidad proliferativa. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

45 En otra realización de métodos de la presente invención, la población de células madre mesenquimales se mantiene en un estado inactivo. "Inactivo" se refiere, en otra realización, a una falta de replicación significativa. En otra realización, el término se refiere a un gran porcentaje de células detenidas en el ciclo celular. En otra realización, las células se detienen en la fase G1. En otra realización, las células se detienen en la fase G2. En otra realización, "inactivo" se refiere a cualquier otra definición del término aceptada en la técnica. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

50 En una realización, cuando la célula madre es una célula mesenquimal humana derivada de médula ósea, la matriz extracelular (ECM) tiene una elasticidad de aproximadamente 250 Pa, y comprende una mezcla de colágeno y fibronectina. En otra realización, el colágeno es colágeno de cola de rata, y la fibronectina es fibronectina humana. La relación del colágeno y la fibronectina puede variar y, en una realización, la relación de colágeno con respecto a fibronectina es de aproximadamente 5:1. Pueden usarse otras relaciones de colágeno y fibronectina. Un experto habitual en la materia apreciará que puede obtenerse colágeno y fibronectina de otras fuentes, y que pueden usarse 55 sustancias distintas de colágeno y fibronectina para presentar elasticidad y unirse con integrinas en la superficie de la membrana celular de modo que se induzca la inactividad de la célula.

60 De acuerdo con realizaciones de la presente invención, el material extracelular (ECM) está provisto de una elasticidad aparente apropiada acoplando el ECM con un sustrato de modo que una célula madre que entra en contacto con el ECM detecta la elasticidad del sustrato. En consecuencia, el sustrato puede ser un material cuya elasticidad, cuando se acopla al ECM, se detecta por una célula madre que entra en contacto con el ECM. En 65

algunas realizaciones, el sustrato es vidrio. En otras realizaciones, el sustrato es un gel con elasticidad de 250 Pa, o un gel con elasticidad de 7500 Pa. Estos geles pueden ser geles de poli(acrilamida) y, como se conoce por los expertos en la materia, la elasticidad de geles de poli(acrilamida) puede variarse, por ejemplo, cambiando las concentraciones de acrilamida y bis(acrilamida) en la formulación de gel. La fabricación de geles de diversa elasticidad que puede usarse en el método de la presente invención resultará evidente para un experto en la materia a la luz de la presente memoria descriptiva.

La elasticidad del ambiente biológico *in vivo* de una célula madre puede determinarse extrayendo una muestra de tejido fisiológico del ambiente *in vivo* inmediato de la célula madre, y midiendo después el módulo de cizalla de esa muestra tisular. Se describen en la presente memoria descriptiva procedimientos ejemplares para preparar y medir la elasticidad de tejido de rata y tejido bovino. La Tabla 1 posterior proporciona la elasticidad de diversos tipos de tejidos:

Tabla 1

Especie	Tejido	Elasticidad (en Pa) (media $\pm$ DT)
Bovino	Médula ósea	220 $\pm$ 50
Rata	Grasa subcutánea	160 $\pm$ 70
Rata	Grasa visceral	130 $\pm$ 70
Rata	Hígado	403 $\pm$ 28
Rata	Músculo esquelético	2251 $\pm$ 166

En una realización, las MSC humanas en geles de 250 Pa están en un estado inactivo esperando una señal adicional para determinar su destino. En una realización, las hMSC experimentarán diferenciación adipogénica (inducida por factores químicos), o en otras realizaciones, un regreso al ciclo celular (inducido por el acoplamiento de las células con una superficie rígida), o diferenciación osteogénica (que parece requerir tanto inducción química como un sustrato rígido). La estimulación de células cultivadas en geles blandos con factores de diferenciación adipogénicos da como resultado en una realización un número notablemente alto de células que acumulan gotas de lípidos. En una realización, se requiere inducción química para diferenciación de osteoblastos. El requisito de estimulación mecánica y química sincronizada explica, en una realización, cómo pueden compartimentalizarse las MSC humanas en tejidos conformes, tales como médula ósea, y aun así resistir a la diferenciación espontánea.

Como la elasticidad de matriz, en otra realización, la elección de ligando extracelular afecta en gran medida a la adhesión y diferenciación de MSC humanas. Se encuentra colágeno tipo 1 en una diversidad de tejidos incluyendo hueso y tejido adiposo, y se usa regularmente como un sustrato para experimentos de adhesión celular. En una realización, en gel de 250 Pa, el colágeno solo no asegura la adhesión eficaz de una mayoría de células. En una realización, una mezcla de colágeno de tipo I y fibronectina a una relación de 10: 1 proporciona la mejor adhesión de células a los geles de 250 Pa sin afectar al potencial de diferenciación.

Las MSC humanas tienen la capacidad de remodelar su microambiente alterando la expresión de metaloproteasas de matriz, y esto ayuda en una realización a promover la diferenciación eficaz después de conseguirse una adhesión fuerte inicial.

En una realización, la síntesis de ADN en MSC humanas se reduce drásticamente cuando se cultivan MSC humanas en geles blandos, desarrollando un fenotipo redondo. Esto se diferencia de otros tipos celulares en proliferación tales como fibroblastos NIH 3T3, células endoteliales aórticas bovinas y células epiteliales NRK que continúan dividiéndose todas cuando se cultivan en geles blandos. Por lo tanto, la inactividad de células madre en geles de 250 Pa no es una insuficiencia de citocinesis inducida por forma general, sino que es más bien una sensibilidad específica a estas células a la conformidad de sustrato. En consecuencia y en una realización, se proporciona en el presente documento un método para mantener células madre en un estado inactivo, que comprende suspender las células madre en un gel de fibronectina/colágeno que tiene  $G'$  de 250 Pa.

En una realización, cuando se presentan MSC humanas no proliferativas con un sustrato de vidrio recubierto con matriz de gel proteico, las células desarrollan una morfología en huso y vuelven a entrar en el ciclo celular. En otra realización, la presencia de un sustrato rígido anula las señales físicas de una matriz conforme. En una realización, no está presente una población significativa de células que muestren un fenotipo neuronal con protusiones de tipo neurita en geles de 250 Pa blandos sin ninguna inducción química.

En una realización, la elasticidad del sustrato regula la diferenciación de células con fenotipos específicos. En otra realización, las propiedades mecánicas solas no dirigen la diferenciación de células madre. Esto se debe a que varios tejidos en el cuerpo tienen elasticidades similares. Por ejemplo, los tejidos cerebral, graso y de médula ósea

tienen todos un módulo de almacenamiento de aproximadamente 200 Pa, pero todos mantienen poblaciones únicas de células. En otra realización, se almacenan MSC humanas *in vivo* en la médula ósea de un individuo durante décadas y aún conservan multipotencialidad. En una realización, se cultivan MSC humanas *ex vivo* en plástico de cultivo tisular rígido y conservan multipotencialidad durante varios pases. En una realización, se integran estímulos tanto mecánicos como químicos por la célula para determinar su respuesta. En otra realización, aunque los estímulos químicos pueden anular las influencias de mecánicas de sustrato, en otras realizaciones, un ambiente mecánico inapropiado evita una respuesta celular normal a agonistas químicos. En una realización, las células inactivas se diferencian en osteoblastos solamente como resultado del cambio de su ambiente tanto físico como químico a los que estimulan la osteogénesis. En consecuencia y en una realización, una matriz con elasticidad apropiada tiene la capacidad de mantener una población inactiva de células madre mesenquimales de médula ósea multipotenciales que responden a estímulos tanto mecánicos como químicos que conducen la proliferación y diferenciación.

La Figura 14 ilustra un diagrama de flujo para preparar una realización de un sistema para inducir inactividad, diferenciación y proliferación en células madre adultas de acuerdo con diversas realizaciones de la presente invención. Se preparan soluciones de acrilamida y bisacrilamida en solución salina tamponada con fosfato (PBS) hasta un volumen total de 500  $\mu$ l. En una realización, el ajuste de la concentración de acrilamida y bisacrilamida permite obtener un amplio intervalo de rigidez. La polimerización se inicia con TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina) y persulfato de amonio para formar un gel. En la etapa 601, solución de acrilamida/bisacrilamida (poliacrilamida), se deposita una gota (por ejemplo, aproximadamente 200  $\mu$ l) del gel polimerizado en un cubreobjetos de vidrio previamente modificado con 3-aminopropiltrimetoxisilano y glutaraldehído. En la etapa 602, recubrimiento con N-hidroxisuccinimida en tolueno, se aplican aproximadamente 15  $\mu$ l de éster de N-hidroxisuccinimida de ácido acrílico 2 % en tolueno a la solución de la etapa 601 y, en la etapa 603, cubreobjetos superior, se coloca un cubreobjetos clorosilanizado sobre la gota. En la etapa 604, retirada de cubreobjetos, el cubreobjetos superior se retira después de completarse la polimerización y, opcionalmente, el gel se ilumina con luz ultravioleta durante aproximadamente 10-15 minutos (no mostrado). En la etapa 605, ligando de ECM, se hace reaccionar acrilato de N-succinimida en la parte superior del gel con un ligando de matriz extracelular, que en una realización es una mezcla de 0,1 mg/ml de colágeno de tipo 1 y 0,02 mg/ml de fibronectina. En una etapa adicional (no representada), los geles se lavan 3 veces con PBS y se dejan en PBS hasta la etapa 606, células en gel, cuando se siembran células madre en las células. Cuando se siembran células madre mesenquimales derivadas de médula ósea en este material, las células se hacen inactivas incluso en presencia de estímulos químicos que provocan proliferación o diferenciación.

En consecuencia y en una realización, se proporciona en el presente documento un método para inducir o mantener la inactividad en una célula madre mesenquimal y mantener la capacidad de la célula para reanudar la proliferación y diferenciación *ex vivo*, que comprende: poner en contacto la célula madre mesenquimal con un gel o matriz de gel recubierto con una proteína de adhesión que se une con integrina en la membrana de la célula madre mesenquimal, teniendo dicho gel o dicha matriz de gel un módulo de cizalla en un intervalo de 150-750 Pa; y proporcionar a la célula madre mesenquimal material nutritivo.

En un método de la presente invención, una célula madre puede ponerse en contacto con ECM apropiado de diversas maneras. Por ejemplo, como se describe en la presente memoria descriptiva, el ECM puede formar una capa acoplada al sustrato, y la célula madre puede colocarse en el ECM. Como alternativa, la célula puede colocarse en ECM acoplado al sustrato y adicionalmente poner en contacto con ECM colocado en la célula, por ejemplo colocando en la célula una estructura que acopla ECM con un sustrato que presenta la elasticidad aparente apropiada para la célula madre.

En otra realización, puede haber dos formulaciones de ECM: una primera formulación, que puede incluir o no materiales nutritivos, que se acopla con el sustrato; y una segunda formulación que incluye materiales nutritivos y que no se acoplan con el sustrato. Se describen estructuras y configuraciones para poner en contacto células madre con un ECM apropiado (incluyendo sustratos y, opcionalmente, materiales de enlace para unir el sustrato con el ECM), en esta memoria descriptiva, incluyendo por ejemplo Figura 6, y son evidentes para un experto en la materia a la luz de la presente memoria descriptiva.

En realizaciones de métodos de la presente invención, una célula madre que no está en un estado inactivo se pone en contacto con ECM de acuerdo con métodos de la presente invención de modo que se induzca inactividad en la célula y pasa de un estado no inactivo a un estado inactivo. En otras realizaciones, una célula madre inactiva se pone en contacto con ECM de acuerdo con métodos de la presente invención de modo que la inactividad se mantenga en la célula y no pase de un estado inactivo.

En consecuencia, se describe en el presente documento un método para modular el desarrollo de una célula madre mesenquimal, que comprende la etapa de suspender la célula madre mesenquimal en una matriz de gel que comprende un agente gelificante en el que dicha matriz de gel se recubre con un colágeno de tipo 1, una fibronectina o una combinación de los mismos y en el que dicha matriz de gel se mantiene a una rigidez predeterminada; y exponer la matriz de gel a un factor modulador del crecimiento, por lo que la exposición al producto químico o factor físico da como resultado un aumento de la rigidez de la matriz de gel para coincidir con la

rigidez del ECM en el microambiente en el que se pretende que la célula madre mesenquimal se diferencie.

5 En otra realización, más del 80 % de las células están detenidas en el ciclo celular. En otra realización, al menos el 80 % de las células están detenidas en el ciclo celular. En otra realización, más del 70 % de las células están detenidas en el ciclo celular. En otra realización, al menos el 70 % de las células están detenidas en el ciclo celular. En otra realización, más del 75 % de las células están detenidas en el ciclo celular. En otra realización, al menos el 75 % de las células están detenidas en el ciclo celular. En otra realización, más del 82 % de las células están detenidas en el ciclo celular. En otra realización, al menos el 82 % de las células están detenidas en el ciclo celular. En otra forma de realización, más del 85 % de las células están detenidas en el ciclo celular. En otra realización, al menos el 85 % de las células están detenidas en el ciclo celular. En otra realización, más del 87 % de las células están detenidas en el ciclo celular. En otra realización, al menos el 87 % de las células están detenidas en el ciclo celular. En otra realización, más del 90 % de las células están detenidas en el ciclo celular. En otra realización, al menos el 90 % de las células están detenidas en el ciclo celular. En otra realización, más del 92 % de las células están detenidas en el ciclo celular. En otra realización, al menos el 92 % de las células están detenidas en el ciclo celular. En otra realización, más del 93 % de las células están detenidas en el ciclo celular. En otra realización, al menos el 93 % de las células están detenidas en el ciclo celular. En otra realización, más del 94 % de las células están detenidas en el ciclo celular. En otra realización, al menos el 94 % de las células están detenidas en el ciclo celular. En otra realización, más del 95 % de las células están detenidas en el ciclo celular. En otra realización, al menos el 95 % de las células están detenidas en el ciclo celular. En otra realización, más del 96 % de las células están detenidas en el ciclo celular. En otra realización, al menos el 96 % de las células están detenidas en el ciclo celular. En otra realización, más del 97 % de las células están detenidas en el ciclo celular. En otra realización, al menos el 97 % de las células están detenidas en el ciclo celular. En otra realización, más del 98 % de las células están detenidas en el ciclo celular. En otra realización, al menos el 98 % de las células están detenidas en el ciclo celular. En otra realización, más del 99 % de las células están detenidas en el ciclo celular. En otra realización, al menos el 99 % de las células están detenidas en el ciclo celular. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

30 En otra realización, la replicación se reduce en 50 %, en relación con replicación en una placa de cultivo tisular. En otra realización, la replicación se reduce en 60 % en relación con una placa de cultivo tisular. En otra realización, la replicación se reduce en 65 % en relación con una placa de cultivo tisular. En otra realización, la replicación se reduce en 70 % en relación con una placa de cultivo tisular. En otra realización, la replicación se reduce en 75 % en relación con una placa de cultivo tisular. En otra realización, la replicación se reduce en 80 % en relación con una placa de cultivo tisular. En otra realización, la replicación se reduce en 85 % en relación con una placa de cultivo tisular. En otra realización, la replicación se reduce en 90 % en relación con una placa de cultivo tisular. En otra realización, la replicación se reduce en 95 % en relación con una placa de cultivo tisular. En otra realización, la replicación se reduce en 97 % en relación con una placa de cultivo tisular. En otra realización, la replicación se reduce en más del 97 % en relación con una placa de cultivo tisular. En otra realización, la replicación se reduce en más del 98 % en relación con una placa de cultivo tisular. En otra realización, la replicación se reduce en más del 99 % en relación con una placa de cultivo tisular. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

45 En otra realización, un método de la presente invención comprende además la etapa de sembrar posteriormente (por ejemplo después de cultivar en presencia de un gel o matriz de gel de métodos de la presente invención) la población de células madre mesenquimales en un aparato de cultivo tisular. En otra realización, el aparato de cultivo tisular contiene medio de inducción. En otra realización, la etapa de siembra posterior se realiza con inducción química. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

50 También se describe en el presente documento un método para estudiar la proliferación o diferenciación de una célula madre mesenquimal que comprende la etapa de cultivar la célula madre mesenquimal en un gel o una matriz de gel con una rigidez en un intervalo de 150-750 Pa, estudiando de este modo la proliferación o diferenciación de una célula madre mesenquimal.

55 La población de adipocitos de métodos de la presente invención es, en otra realización, una población que comprende adipocitos. En otra realización, la población se enriquece con respecto a adipocitos. En otra realización, la población es una población de adipocitos parcialmente purificada. En otra realización, los adipocitos se aíslan de una fuente biológica, seguido de una etapa de purificación o enriquecimiento. En otra realización, el aislamiento de la fuente biológica se sigue de cultivo. En otra realización, el aislamiento de la fuente biológica se sigue de cultivo y una etapa de purificación o enriquecimiento. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

60 En otra realización, la población celular de métodos de la presente invención se cultiva en presencia de un gel o una matriz de gel de métodos de la presente invención. En otra realización, la población celular se cultiva en el gel o la matriz de gel. En otra realización, la población celular se cultiva en el gel o la matriz de gel. En otra realización, la población celular se cultiva en un aparato de cultivo tisular que contiene el gel o la matriz de gel. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

La “población de células madre mesenquimales” se refiere, en otra realización, a una población que comprende células madre mesenquimales (MSC). En otra realización, la población se enriquece con respecto a MSC. En otra realización, la población es una población de MSC parcialmente purificada. En otra realización, las MSC se aíslan de una fuente biológica, seguida de una etapa de purificación o enriquecimiento. En otra realización, el aislamiento de la fuente biológica se sigue de cultivo. En otra realización, el aislamiento de la fuente biológica se sigue de cultivo y una etapa de purificación o enriquecimiento. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

Las células “mesenquimales” de métodos de la presente invención se aíslan o purifican, en otra realización, a partir de médula ósea. En otra realización, las células son células madre mesenquimales derivadas de médula ósea. En otra realización, las células se aíslan o purifican de tejido adiposo. En otra realización, las células se aíslan o purifican de cartílago. En otra realización, las células se aíslan o purifican de cualquier otro tejido conocido en la técnica. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

En otra realización, un gel o una matriz de gel de los métodos de la presente invención tienen una rigidez de 150-750 pascales (Pa). En otra realización, un gel o una matriz de gel de los métodos de la presente invención tienen un módulo de cizalla de 150-750 Pa. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

En otra realización, un gel o una matriz de gel de los métodos de la presente invención tienen una rigidez equivalente a un tejido biológico. En otra realización, el tejido biológico es médula ósea. En otra realización, el tejido biológico es tejido graso. En otra realización, el tejido biológico es cualquier otro tejido biológico conocido en la técnica. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

En una realización, la matriz de gel descrita en el presente documento es capaz de formar geles de diversas potencias, dependiendo de su estructura y concentración así como, en otra realización, factores ambientales tales como fuerza iónica, pH y temperatura. La viscosidad y el comportamiento del gel combinados denominados “viscoelasticidad” en una realización, se examinan determinando el efecto que tiene una fuerza oscilante en el movimiento del material. En otra realización el módulo elástico (G'), módulo viscoso (G'') y viscosidad compleja ( $\eta^*$ ) son los parámetros que se busca cambiar usando los métodos descritos en el presente documento, y estos se analizan en otra realización variando la tensión o presión de forma armónica con el tiempo (Tabla 1). Estos parámetros se derivan del módulo complejo ( $G^*$ ), que es la relación de tensión máxima frente a presión máxima, y el ángulo de fase ( $\omega$ ), que es el ángulo en que están fuera de fase la tensión y la presión.

Tabla 2. Relación entre módulos dinámicos, ángulo de fase ( $\delta$ ) y frecuencia ( $\omega$ ).

Término	Símbolo	Definición	Información proporcionada
Módulo complejo	$G^*$	$[(G')^2 + (G'')^2]^{0.5}$	Todas las características viscoelásticas
Módulo elástico, módulo de almacenamiento	$G'$	$G^* \cos \delta$	Energía almacenada por cada ciclo de deformación; comportamiento tipo sólido o elástico
Módulo viscoso, módulo de pérdida	$G''$	$G^* \sin \delta$	Energía disipada por ciclo de deformación; comportamiento de tipo líquido o viscoso
Viscosidad compleja	$\eta^*$	$G''/\omega$	Flujo viscoelástico

En una realización, en las matrices de gel descritas en el presente documento, parte de la deformación provocada por tensión de cizalla es elástica y volverá a cero cuando se retire la fuerza. La deformación restante tal como la deformación creada por el desplazamiento deslizante de las cadenas a través del disolvente en una realización no volverá a cero cuando se retire la fuerza. Bajo fuerza constante el desplazamiento elástico permanece constante en una realización, mientras que el desplazamiento deslizante continúa, aumentando de este modo.

En una realización, el término “elástico” o “elasticidad”, y términos similares se refieren a una propiedad física de las matrices de gel descritas en el presente documento, concretamente la deformabilidad del gel bajo fuerza mecánica y la capacidad de la matriz de gel para conservar su forma original cuando se retire la fuerza deformante. En otra realización, la expresión “módulo elástico” se refiere a módulo de Young y es una medida de la relación de (a) la tensión uniaxial a lo largo de un eje del material con respecto a (b) la tensión normal adjunta a lo largo de ese eje.

El módulo de cizalla (resultante de la tensión cambiante) es la relación de la tensión de cizalla con respecto a la presión de cizalla. Se deduce a partir de la relación compleja similar a la anterior que:

$$G^* = G' + iG''$$

donde  $G^*$  es el módulo de cizalla complejo,  $G'$  es el módulo de almacenamiento en fase,  $i$  es un factor relacionado con el material y  $G''$  es el módulo de pérdida dirigido de forma similar fuera de fase;  $G^* = E (G'^2 + G''^2)^{0.5}$ . La frecuencia con la que estos parámetros se cruzan corresponde a un tiempo de relajación ( $\tau$ ) específico del material.



En una realización, se determinan propiedades viscoelásticas lineales de las matrices de gel descritas en el presente documento por mediciones en un flujo de cizalla oscilante a amplitud pequeña y con frecuencia angular variable. Los valores para  $G'$  y  $G''$  se determinan en gran medida aquí por la concentración de los derivados de celulosa en la solución acuosa y la magnitud del valor de viscosidad representativo. Por lo tanto, en lo sucesivo en el presente documento, solamente se considera la evolución relativa de  $G'$  y  $G''$  con frecuencia angular creciente ( $\omega$ ). En otra realización, a una concentración de 1,5 a 2 % (p/p) de derivado de celulosa de solución acuosa y una temperatura de aproximadamente 20 °C, el comportamiento de  $G'$  y  $G''$  para los derivados de celulosa es tal que a una frecuencia angular baja ( $\omega$ ), el módulo de almacenamiento  $G'$  es menor que el módulo de pérdida  $G''$ , pero con el aumento de la frecuencia angular  $G'$  aumenta más que  $G''$ . En otra realización,  $G'$ , por encima de una cierta frecuencia angular, finalmente se hace mayor que  $G''$ , y la solución a valores altos de frecuencia angular reacciona por lo tanto predominantemente de forma elástica. Este comportamiento se atenúa o cambia usando los métodos de modulación descritos en el presente documento.

En otra realización, el término "elasticidad" se refiere a la propiedad física de un material que define su capacidad para deformarse por tensión, sea la deformación reversible o no. Como se usan en la presente memoria descriptiva, la elasticidad y la rigidez están relacionadas de forma inversa, y la elasticidad (rigidez) de un material puede medirse usando un reómetro de espectrómetro de fluidos RFS III, disponible de Rheometrics, Piscataway, NJ, usando una presión de cizalla oscilante del 2 % a una frecuencia de 10 radianes por segundo. La elasticidad y otras propiedades reológicas de las células y otros tejidos fisiológicos puede medirse usando cualquiera de una diversidad de métodos conocidos por los expertos en la materia. Dichos métodos pueden implicar el uso de reómetros o microscopios de fuerza atómica, como ejemplo (véase, por ejemplo, Engler AJ, Rehfeldt F, Sen S, Discher DE, "Microtissue elasticity: measurements by atomic force microscopy and its influence on cell differentiation," *Methods Cell Biol.* 2007;83:521-45; 15 Yeung T, Georges PC, Flanagan LA, Marg B, Ortiz M, Funaki M, Zahir N, Ming W, Weaver V, Janmey PA, "Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion," *Cell Motil Cytoskeleton.* Ene 2005; 60(1): 24-34.).

En una realización, la expresión "viscosidad intrínseca" ( $[\eta^*]$ ) se refiere al límite de la viscosidad reducida extrapolada a concentración cero. Como con la viscosidad reducida, tiene unidades de concentración recíproca, por ejemplo,  $\text{ml g}^{-1}$ .

En una realización, la rigidez o dureza, se refiere a los valores de  $G'$  observados o medidos.

En otra realización, un gel o una matriz de gel de métodos de la presente invención se recubren con una solución que comprende una proteína de adhesión. En otra realización, la proteína de adhesión es un colágeno. En otra realización, la proteína de adhesión es un colágeno de tipo 1. En otra realización, la proteína de adhesión es una fibronectina. En otra realización, la proteína de adhesión es cualquier otra proteína de adhesión conocida en la técnica. En otra realización, el gel o la matriz de gel se recubren con una solución que comprende una combinación de proteínas de adhesión. En otra realización, el gel o la matriz de gel se recubren con una solución que comprende un colágeno y una fibronectina. En otra realización, el gel o la matriz de gel se recubre con una solución que comprende un colágeno de tipo I y una fibronectina. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

En otra realización, el colágeno de métodos de la presente invención es un colágeno recombinante. En otra realización, el colágeno se purifica a partir de una fuente biológica. En otra realización, el colágeno es un colágeno de tipo 1. En otra realización, el colágeno es cualquier otro tipo de colágeno conocido en la técnica. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

En otra realización, la fibronectina de métodos de la presente invención es un fibronectina recombinante. En otra realización, la fibronectina se purifica a partir de una fuente biológica. En otra realización, la fibronectina es un fibronectina de tipo 1. En otra realización, la fibronectina es cualquier otro tipo de fibronectina conocida en la técnica. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

El agente gelificante de métodos de la presente invención es, en otra realización, una acrilamida. En otra realización, el agente gelificante es una mezcla de acrilamida-bisacrilamida. En otra realización, el agente gelificante comprende acrilamida. En otra realización, el agente gelificante comprende una mezcla de acrilamida-bisacrilamida. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

En otra realización, un gel de acrilamida de métodos de la presente invención tiene una relación de acrilamida:bisacrilamida de entre 100:1 y 30:1. En otra realización, el gel de acrilamida se prepara a partir de una solución que tiene una relación de acrilamida:bisacrilamida de entre 100:1 y 30:1. En otra realización, la relación es de entre 100:1 y 20:1. En otra realización, la relación de acrilamida:bisacrilamida es de entre 100:1 y 40:1. En otra realización, la relación es entre 100:1 y 50:1. En otra realización, la relación es entre 100:1 y 60:1. En otra realización, la relación es entre 100:1 y 70:1. En otra realización, la relación es entre 120:1 y 30:1. En otra realización, la relación es entre 120:1 y 40:1. En otra realización, la relación es entre 120:1 y 50:1. En otra realización, la relación es entre 120:1 y 60:1. En otra realización, la relación es entre 120:1 y 70:1. En otra realización, la relación es entre 90:1 y 20:1. En otra realización, la relación es entre 90:1 y 30:1. En otra realización,

la relación es entre 90:1 y 40:1. En otra realización, la relación es entre 90:1 y 50:1. En otra realización, la relación es entre 90:1 y 60:1. En otra realización, la relación es entre 80:1 y 20:1. En otra realización, la relación es entre 80:1 y 30:1. En otra realización, la relación es entre 80:1 y 40:1. En otra realización, la relación es entre 80:1 y 50:1.

5 En otra realización, la relación es 30:1. En otra realización, la relación es 20:1. En otra realización, la relación es 25:1. En otra realización, la relación es 35:1. En otra realización, la relación es 40:1. En otra realización, la relación es 45:1. En otra realización, la relación es 50:1. En otra realización, la relación es 55:1. En otra realización, la relación es 60:1. En otra realización, la relación es 65:1. En otra realización, la relación es 70:1. En otra realización, la relación es 75:1. En otra realización, la relación es 80:1. En otra realización, la relación es 85:1. En otra realización, la relación es 90:1. En otra realización, la relación es 95:1. En otra realización, la relación es 100:1.

Cada relación de acrilamida:bisacrilamida representa una realización distinta de la presente invención.

15 En otra realización, un gel de acrilamida de métodos de la presente invención tiene una concentración de acrilamida total de 3-5 %. En otra realización, el gel de acrilamida se prepara a partir de una solución que tiene una concentración de acrilamida total de 3-5 %. En otra realización, la concentración de acrilamida total es del 2 %. En otra realización, la concentración es del 2,5 %. En otra realización, la concentración es del 3 %. En otra realización, la concentración es del 3,5 %. En otra realización, la concentración es del 4 %. En otra realización, la concentración es del 4,5 %. En otra realización, la concentración es del 5 %. En otra realización, la concentración es del 5,5 %. En otra realización, la concentración es del 6 %. En otra realización, la concentración es del 2-5 %. En otra realización, la concentración es del 2,5 a 5 %. En otra realización, la concentración es del 3,5 a 5 %. En otra realización, la concentración es del 2-4 %. En otra realización, la concentración es del 2-4,5 %. En otra realización, la concentración es del 2-5 %. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

25 En otra realización, el agente gelificante de métodos de la presente invención es una proteína fibrina. En otra realización, el agente gelificante es una proteína de fibrinógeno. En otra realización, el fibrinógeno está desprovisto de factores de coagulación. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

30 En otra realización, la concentración de la proteína fibrina o fibrinógeno recombinante en un gel o una matriz de gel de métodos de la presente invención es 3-10 mg/ml. En otra realización, la concentración es 3-12 mg/ml. En otra realización, la concentración es 3-9 mg/ml. En otra realización, la concentración es 3-8 mg/ml. En otra realización, la concentración es 3-7 mg/ml. En otra realización, la concentración es 3-6 mg/ml. En otra realización, la concentración es 2-12 mg/ml. En otra realización, la concentración es 2-10 mg/ml. En otra realización, la concentración es 2-9 mg/ml. En otra realización, la concentración es 2-8 mg/ml. En otra realización, la concentración es 2-7 mg/ml. En otra realización, la concentración es 2-6 mg/ml. En otra realización, la concentración es 4-12 mg/ml. En otra realización, la concentración es 4-10 mg/ml. En otra realización, la concentración es 4-9 mg/ml. En otra realización, la concentración es 4-8 mg/ml. En otra realización, la concentración es 4-7 mg/ml. En otra realización, la concentración es 5-12 mg/ml. En otra realización, la concentración es 5-10 mg/ml. En otra realización, la concentración es 5-9 mg/ml. En otra realización, la concentración es 5-8 mg/ml. En otra realización, la concentración es 2 mg/ml. En otra realización, la concentración es 2,5 mg/ml. En otra realización, la concentración es 3 mg/ml. En otra realización, la concentración es 3,5 mg/ml. En otra realización, la concentración es 4 mg/ml. En otra realización, la concentración es 4,5 mg/ml. En otra realización, la concentración es 5 mg/ml. En otra realización, la concentración es 6 mg/ml. En otra realización, la concentración es 7 mg/ml. En otra realización, la concentración es 8 mg/ml. En otra realización, la concentración es 9 mg/ml. En otra realización, la concentración es 10 mg/ml. En otra realización, la concentración es 11 mg/ml. En otra realización, la concentración es 12 mg/ml. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

50 En otra realización, una proteína fibrina o fibrinógeno de métodos de la presente invención es una proteína fibrina o fibrinógeno de un animal heterotérmico. En otra realización, la proteína fibrina o fibrinógeno es una proteína fibrina o fibrinógeno de un animal homeotérmico. En otra realización, la fibrina o el fibrinógeno es de un pez. En otra realización, la fibrina o el fibrinógeno es de un salmón. En otra realización, la fibrina o el fibrinógeno es de cualquier otro pez conocido en la técnica. En otra realización, la fibrina o el fibrinógeno es de cualquier otro heterotermo conocido en la técnica. En otra realización, la fibrina o el fibrinógeno es de un mamífero. En otra realización, la fibrina o el fibrinógeno es fibrina o fibrinógeno humano. En otra realización, la fibrina o el fibrinógeno es fibrina o fibrinógeno bovino. En otra realización, la fibrina o el fibrinógeno es de cualquier otro mamífero conocido en la técnica. En otra realización, la fibrina o el fibrinógeno es de cualquier otro homeotermo conocido en la técnica. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

60 En otra realización, el agente gelificante es agarosa. En otra realización, el agente gelificante es agar. En otra realización, el agente gelificante es un glicosaminoglicano. En otra realización, el agente gelificante es un colágeno. En otra realización, el agente gelificante es carragenina. En otra realización, el agente gelificante es carragenano. En otra realización, el agente gelificante es goma de algarrobo. En otra realización, el agente gelificante es glicerina. En otra realización, el agente gelificante de métodos de la presente invención es cualquier otro agente gelificante conocido en la técnica. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

65 El gel o la matriz de gel de los métodos de la presente invención es, en otra realización, un gel o una matriz de gel bidimensional. En otra realización, el gel o la matriz de gel es un gel o una matriz de gel tridimensional. En otra

realización, el gel o la matriz de gel es cualquier otro tipo de gel o matriz de gel conocido en la técnica. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

5 En otra realización, un gel o una matriz de gel de métodos de la presente invención comprende además un suero animal. En otra realización, el suero animal es un suero bovino fetal. En otra realización, el suero animal es un suero de ternero bovino. En otra realización, el suero animal es un suero de caballo. En otra realización, el suero animal es cualquier otro tipo de suero animal que contenga factor de crecimiento conocido en la técnica. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

10 En otra realización, un gel o una matriz de gel de métodos de la presente invención comprende además un inhibidor de proteasa.

15 En otra realización, un inhibidor de proteasa de métodos de la presente invención inhibe la función de una peptidasa. En otra realización, el inhibidor de proteasa es una proteína. En algunas realizaciones, el inhibidor de proteasa es un inhibidor de cisteína proteasa, un inhibidor de serina proteasa (serpina), un inhibidor de tripsina, un inhibidor de treonina proteasa, un inhibidor de proteasa aspártica o un inhibidor de metaloproteasa. En otra realización, un inhibidor de proteasa es un inhibidor suicida, un inhibidor de estado de transición o un agente quelante.

20 En otra realización, el inhibidor de proteasa es inhibidor de tripsina de soja (SBTI). En otra realización, el inhibidor de proteasa es AEBSF-HCl. En otra realización, el inhibidor es ácido (épsilon)-aminocaproico. En otra realización, el inhibidor es (alfa) 1-antitripsina. En otra realización, el inhibidor es antitrombina III. En otra realización, el inhibidor es (alfa) 1-antitripsina (inhibidor de [alfa] 1-proteinasa). En otra realización, el inhibidor es APMSF-HCl (sulfonil fluoruro de 4-amidinofenil-metano). En otra realización, el inhibidor es esprotinina. En otra realización, el inhibidor es benzamidina-HCl. En otra realización, el inhibidor es quimostatina. En otra realización, el inhibidor es DFP (diisopropilfluoro-fosfato). En otra realización, el inhibidor es leupeptina. En otra realización, el inhibidor es PEFABLOC® SC (clorhidrato de 4-(2-aminoetil)-bencenosulfonil fluoruro). En otra realización, el inhibidor es PMSF (fenilmetil sulfonil fluoruro). En otra realización, el inhibidor es TLCK (1-cloro-3-tosilamido-7-amino-2-heptanona HCl). En otra realización, el inhibidor es TPCK (1-cloro-3-tosilamido-4-fenil-2-butanona). En otra realización, el inhibidor es inhibidor de tripsina de clara de huevo (ovomucoide). En otra realización, el inhibidor es inhibidor de tripsina de soja.

30 En otra realización, el inhibidor es aprotinina. En otra realización, el inhibidor es pentamidina isetionato. En otra realización, el inhibidor es pepstatina. En otra realización, el inhibidor es guanidinio. En otra realización, el inhibidor es alfa2-macroglobulina. En otra realización, el inhibidor es un agente quelante de cinc. En otra realización, el inhibidor es yodoacetato. En otra realización, el inhibidor es cinc. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

35 En otra realización, la cantidad de inhibidor de proteasa utilizado en métodos de la presente invención es 0,1 mg/litro. En otra realización, la cantidad de inhibidor de proteasa es 0,2 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 0,3 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 0,4 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 0,6 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 0,8 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 1 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 1,5 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 2 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 2,5 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 3 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 5 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 7 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 10 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 12 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 15 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 20 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 30 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 50 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 70 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 100 mg/litro.

50 En otra realización, la cantidad de inhibidor de proteasa es 0,1-1 mg/litro. En otra realización, la cantidad de inhibidor de proteasa es 0,2-1 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 0,3-1 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 0,5-1 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 0,1-2 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 0,2-2 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 0,3-2 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 0,5-2 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 1-2 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 1-10 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 2-10 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 3-10 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 5-10 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 1-20 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 2-20 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 3-20 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 5-20 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 10-20 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 10-100 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 20-100 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 30-100 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 50-100 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 10-200 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 20-200 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 30-200 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 50-200 mg/litro. En otra realización, la cantidad es 100-200 mg/litro.

60 En otra realización, la cantidad de inhibidor de proteasa utilizado en métodos de la presente invención es 1000 u.i.k. (unidades inactivadoras de kalicreína)/litro. En otra realización, la cantidad es 10 u.i.k./litro. En otra realización, la cantidad es 12 u.i.k./litro. En otra realización, la cantidad es 15 u.i.k./litro. En otra realización, la cantidad es 20 u.i.k./litro. En otra realización, la cantidad es 30 u.i.k./litro. En otra realización, la cantidad es 40 u.i.k./litro. En otra realización, la cantidad es 50 u.i.k./litro. En otra realización, la cantidad es 70 u.i.k./litro. En otra realización, la cantidad es 100 u.i.k./litro. En otra realización, la cantidad es 150 u.i.k./litro. En otra realización, la cantidad es 200

u.i.k./litro. En otra realización, la cantidad es 300 u.i.k./litro. En otra realización, la cantidad es 500 u.i.k./litro. En otra realización, la cantidad es 700 u.i.k./litro. En otra realización, la cantidad es 1500 u.i.k./litro. En otra realización, la cantidad es 3000 u.i.k./litro. En otra realización, la cantidad es 4000 u.i.k./litro. En otra realización, la cantidad es 5000 u.i.k./litro

5 Cada cantidad del inhibidor de proteasa representa una realización distinta de la presente invención.

10 En otra realización, la proteasa a la que se dirige el inhibidor de proteasa de métodos de la presente invención es una seria proteasa. En otra realización, la proteasa es tripsina. En otra realización, la proteasa es quimotripsina. En otra realización, la proteasa es carboxipeptidasa. En otra realización, la proteasa es aminopeptidasa. En otra realización, la proteasa es cualquier otra proteasa que actúe en el duodeno o el intestino delgado. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

15 La población de células madre mesenquimales de métodos de la presente invención es, en otra realización, una población de células madre mesenquimales adultas. En otra realización, la población de células madre mesenquimales es una población de células madre mesenquimales juveniles. En otra realización, la población de células madre mesenquimales es una población de células madre mesenquimales infantiles. En otra realización, la población de células madre mesenquimales es una población de células madre mesenquimales fetales. En otra realización, la población de células madre mesenquimales es una población de células madre mesenquimales humanas. En otra realización, la población de células madre mesenquimales es de cualquier animal conocido en la técnica. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

25 En otra realización, el tipo celular de interés es una célula madre. En otra realización, el tipo celular de interés es una célula madre hematopoyética. En otra realización, el tipo celular de interés es un adipocito. En otra realización, el tipo celular de interés es una célula progenitora endotelial. En otra realización, el tipo celular de interés es una célula madre neural. En otra realización, el tipo celular de interés es una célula progenitora residente en tejido adulto. En otra realización, el tipo celular de interés es una célula progenitora pancreática residente en tejido adulto. En otra realización, el tipo celular de interés es una célula beta nativa regenerativa. En otra realización, el tipo celular de interés es una célula madre gastrointestinal. En otra realización, el tipo celular de interés es una célula madre epitelial hepatopancreática. En otra realización, el tipo celular de interés es una célula madre epidérmica. En otra realización, el tipo celular de interés es una célula madre epitelial intestinal. En otra realización, el tipo celular de interés es una célula madre retiniana. En otra realización, el tipo celular de interés es una célula madre epitelial neuronal. En otra realización, el tipo celular de interés es una célula madre muscular. En otra realización, el tipo celular de interés es una célula madre endotelial. En otra realización, el tipo celular de interés es una célula madre de sangre periférica. En otra realización, el tipo celular de interés es cualquier otro tipo de célula madre conocido en la técnica

40 En otra realización, el tipo celular de interés es una célula progenitora. En otra realización, el tipo celular de interés es una célula progenitora condrogénica. En otra realización, el tipo celular de interés es una célula progenitora adipogénica. En otra realización, el tipo celular de interés es una célula progenitora del estroma de la médula. En otra realización, el tipo celular de interés es una célula progenitora miogénica. En otra realización, el tipo celular de interés es una célula progenitora osteogénica. En otra realización, el tipo celular de interés es una célula progenitora de tendón. En otra realización, el tipo celular de interés es cualquier otro tipo de célula progenitora conocida en la técnica.

45 En otra realización, el tipo celular de interés es un tipo celular descendiente. En otra realización, el tipo celular de interés es un condrocito. En otra realización, el tipo celular de interés es una célula del estroma. En otra realización, el tipo celular de interés es una célula del miotubo. En otra realización, el tipo celular de interés es un osteocito. En otra realización, el tipo celular de interés es un tenocito. En otra realización, el tipo celular de interés es cualquier otro tipo celular descendiente conocido en la técnica.

50 En otra realización, un método de la presente invención comprende además la etapa de incubar las células madre mesenquimales en un medio de inducción. En otra realización, el medio de inducción es un medio de inducción de células madre. En otra realización, el medio de inducción es un medio de inducción de osteoblastos. En otra realización, el medio de inducción es un medio de inducción de células madre hematopoyéticas. En otra realización, el medio de inducción es un medio de inducción de adipocitos. En otra realización, el medio de inducción es un medio de inducción de células madre progenitoras endoteliales. En otra realización, el medio de inducción es un medio de inducción de células madre neurales. En otra realización, el medio de inducción es un medio de inducción de células progenitoras residentes en tejido adulto. En otra realización, el medio de inducción es un medio de inducción de células progenitoras pancreáticas residentes en tejido adulto. En otra realización, el medio de inducción es un medio de inducción de las células progenitoras beta nativas regenerativas. En otra realización, el medio de inducción es un medio de inducción de células madre gastrointestinales. En otra realización, el medio de inducción es un medio de inducción de células madre epiteliales hepatopancreáticas. En otra realización, el medio de inducción es un medio de inducción de células madre epiteliales. En otra realización, el medio de inducción es un medio de inducción de células madre epiteliales intestinales. En otra realización, el medio de inducción es un medio de inducción de células madre retinianas. En otra realización, el medio de inducción es un medio de inducción de células madre epiteliales

neuronales. En otra realización, el medio de inducción es un medio de inducción de células madre musculares. En otra realización, el medio de inducción es un medio de inducción de células madre endoteliales. En otra realización, el medio de inducción es un medio de inducción de células madre de sangre periférica. En otra realización, el medio de inducción es cualquier otro tipo de medio de inducción conocido en la técnica.

5 En otra realización, el medio de inducción es un medio de inducción de células progenitoras. En otra realización, el medio de inducción es un medio de inducción de células progenitoras condrogénicas. En otra realización, el medio de inducción es un medio de inducción de células progenitoras adipogénicas. En otra realización, el medio de inducción es un medio de inducción de células progenitoras del estroma de la médula. En otra realización, el medio de inducción es un medio de inducción de células progenitoras miogénicas. En otra realización, el medio de inducción es un medio de inducción de células progenitoras osteogénicas. En otra realización, el medio de inducción es un medio de inducción de células progenitoras de tendón. En otra realización, el medio de inducción es cualquier otro tipo de célula progenitora conocida en la técnica.

15 En otra realización, el medio de inducción es cualquier otro tipo de medio de inducción conocido en la técnica. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

La etapa de cultivo de métodos de la presente invención se realiza, en otra realización, durante al menos 5 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante al menos 4 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante al menos 6 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante al menos 7 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante al menos 8 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante al menos 10 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante al menos 12 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante al menos 15 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante al menos 20 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante al menos 25 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante al menos 30 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante al menos 35 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante al menos 40 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante al menos 50 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante al menos 60 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante más de 4 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante más de 6 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante más de 7 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante más de 8 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante más de 10 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante más de 12 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante más de 15 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante más de 20 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante más de 25 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante más de 30 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante más de 35 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante más de 40 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante más de 50 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante más de 60 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante 4 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante 6 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante 7 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante 8 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante 10 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante 12 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante 15 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante 20 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante 25 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante 30 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante 35 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante 40 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante 50 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante 60 días. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza durante más de 60 días. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

En otra realización, la etapa de cultivo de la población de células madre mesenquimales en un gel o una matriz de gel de métodos de la presente invención se precede de una etapa de cultivo de las células madre mesenquimales en un aparato de cultivo tisular. En otra realización, el aparato de cultivo tisular es un plato. En otra realización, el aparato de cultivo tisular es una placa. En otra realización, el aparato de cultivo tisular es un matraz. En otra realización, el aparato de cultivo tisular es un frasco. En otra realización, el aparato de cultivo tisular es un tubo. En otra realización, el aparato de cultivo tisular es cualquier otro tipo de aparato de cultivo tisular conocido en la técnica. En otra realización, la etapa de cultivo se precede de una etapa de cultivo de las células madre mesenquimales en medio de cultivo tisular; por ejemplo no en presencia de un gel o una matriz de gel de métodos de la presente invención. En otra realización, la etapa de cultivo de las células en un aparato de cultivo tisular o en medio de cultivo tisular se realiza después del aislamiento de la población de células madre mesenquimales de una muestra biológica. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza después de purificación de la población de células madre mesenquimales de una muestra biológica. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza después de enriquecimiento de la población de células madre mesenquimales en una muestra biológica. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

En otra realización, la etapa de cultivo de la población de células madre mesenquimales en un gel o una matriz de gel de métodos de la presente invención se realiza directamente después del aislamiento de la población de células madre mesenquimales de una muestra biológica. En otra realización, la etapa de cultivo se realiza directamente después de purificación de la población de células madre mesenquimales de una muestra biológica. En otra

realización, la etapa de cultivo se realiza directamente después de enriquecimiento de la población de células madre mesenquimales en una muestra biológica. "Directamente" se refiere, en otra realización, a una etapa de cultivo en ausencia de cultivo primero en un aparato de cultivo tisular. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

5 La población de células progenitoras de métodos de la presente invención es, en otra realización, una población de células madre hematopoyéticas. En otra realización, la población de células progenitoras es una población precursora de células endoteliales. En otra realización, la población de células progenitoras es una población de células satélite (por ejemplo precursores de células musculares). En otra realización, la población de células  
10 progenitoras es una población de progenitores neurales amplificadores de tránsito de la corriente migratoria rostral. En otra realización, la población de células progenitoras es una población de células del estroma de la médula ósea. En otra realización, la población de células progenitoras es cualquier otra población de células progenitoras conocida en la técnica. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

15 "Población de células progenitoras" se refiere, en otra realización, a una población que comprende células progenitoras. En otra realización, la población se enriquece con respecto a células progenitoras. En otra realización, la población es una población celular progenitora parcialmente purificada. En otra realización, las células progenitoras se aíslan de una fuente biológica, seguida de una etapa de purificación o enriquecimiento. En otra  
20 realización, el aislamiento de la fuente biológica se sigue de cultivo. En otra realización, el aislamiento de la fuente biológica se sigue de cultivo y una etapa de purificación o enriquecimiento. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

También se describe en el presente documento un método para diferenciar una célula transformada en un tipo celular diferenciado, que comprende la etapa de cultivar la célula transformada en un gel o una matriz de gel de  
25 métodos de la presente invención, diferenciando de este modo una célula transformada en un tipo celular diferenciado. En otra realización, el tipo celular diferenciado es una célula progenitora. En otra realización, el tipo celular diferenciado es un tipo celular descendiente. En otra realización, el tipo celular diferenciado es un tipo celular tisular. En otra realización, el tipo celular diferenciado es uno de los tipos celulares anteriores. En otra realización, el tipo celular diferenciado es cualquier otro tipo de tipo celular diferenciado conocido en la técnica. Cada posibilidad  
30 representa una realización distinta.

En otra realización, una célula o población celular preparada por un método de la presente invención se usa para reemplazar tejidos dañados en un sujeto. En otra realización, una célula o población celular preparada por un  
35 método de la presente invención se usa como vehículo para agentes antineoplásicos (Kassem M, Ann N Y Acad Sci. May 2006; 1067: 436-42). Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

Se conocen bien en la técnica métodos para determinar la capacidad proliferativa y potencia de diferenciación de células madre mesenquimales, y se describen, por ejemplo, en Baxter MA *et al* (Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. Stem Cells. 2004; 22(5): 675-82), Liu L *et al* (Telomerase deficiency impairs differentiation of mesenchymal stem cells. Exp Cell Res. 10 mar 2004; 294 (1): 1-8),  
40 y Bonab MM *et al* (Aging of mesenchymal stem cell in vitro. BMC Cell Biol. 10 mar 2006; 7: 14). Cada posibilidad representa otra realización de la presente invención.

En otra realización, una ventaja de los métodos de la presente invención es la falta de inmortalización de células madre mesenquimales. En otra realización, una ventaja es la falta de evolución de células cancerosas de una  
45 población de células madre mesenquimales. En otra realización una ventaja es la conservación de la capacidad de las células diana para diferenciarse en múltiples tipos celulares. En otra realización, una ventaja es la conservación de la capacidad proliferativa de las células. En otra realización, una ventaja es la conservación de la capacidad de las células para apoyar el crecimiento de células hematopoyéticas. En otra realización, una ventaja es la capacidad de las células diana para diferenciarse sin un requisito de inhibición de contacto. En otra realización, la diferenciación es una consecuencia de la inhibición de proliferación. Cada posibilidad representa otra realización de la presente invención.  
50

En una realización, se proporcionan en el presente documento métodos para inducir la proliferación de una célula madre somática inactiva. Se ha descubierto que poniendo en contacto una célula madre con un material que es menos elástico que la elasticidad del microambiente *in vivo* de origen natural del mismo tipo de célula madre es eficaz para inducir proliferación de la célula madre. Las realizaciones de la presente invención incluyen por lo tanto  
55 poner en contacto la célula madre somática con un material que comprende compuestos que se unen con integrinas en la superficie de la membrana celular y que tienen elasticidad aparente para la célula madre menor que la elasticidad del material predominante en el microambiente biológico de una célula madre somática *in vivo* del mismo tipo que la célula madre somática. Por ejemplo, la proliferación de células madre inactivas puede inducirse colocándolas en un portaobjetos de vidrio, que tiene una rigidez de más de 1 gigaPascal (una fracción pequeña de la elasticidad de la mayoría de los tipos tisulares humanos o animales) y que se recubre con un material que entra en contacto con las integrinas en la célula. En otras realizaciones, puede inducirse proliferación de una célula madre  
60 poniendo en contacto la célula con un material aparente para la célula que tiene una elasticidad de menos de 0,1 de la elasticidad del microambiente *in vivo* natural de la célula madre. En otras realizaciones, puede inducirse  
65

proliferación poniendo en contacto la célula madre con un material que tiene una elasticidad aparente para la célula madre de menos de aproximadamente 0,5 veces (por ejemplo, de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 0,5 veces) la elasticidad del microambiente *in vivo* natural de la célula madre.

5 En realizaciones, la célula también puede estar provista de material de crecimiento de nutrientes, por ejemplo, incluyendo factores de crecimiento y suero, para promover la proliferación y mantener la actividad biológica de la célula madre y su descendencia *ex vivo*. La formulación del material de crecimiento de nutrientes para tipos celulares particulares se conoce por los expertos en la materia, y no debería ser necesaria ninguna variación de materiales de crecimiento de nutrientes conocidos para tipos particulares de células madre para la práctica de este aspecto de la presente invención.

10 Como con otro aspecto de la presente invención, pueden practicarse realizaciones de este aspecto inductor de proliferación con células madre, incluyendo MSC. Las MSC pueden recogerse de tejido vivo, como se describe en esta memoria descriptiva, o derivarse de otras fuentes tales como cultivos *in vitro* y células madre congeladas de forma criogénica. Dichas células pueden estar en un estado inactivo de origen natural o un estado inactivo inducido artificialmente y pueden incluir por ejemplo células en las que se ha inducido o mantenido inactividad usando métodos de la presente invención. En consecuencia, las células en las que puede inducirse proliferación de acuerdo con métodos de la presente invención pueden incluir células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (MSC), células madre renales, células madre hepáticas, células madre derivadas de músculo esquelético, células madre derivadas de hueso, MSC de pulpa dental, MSC derivadas de músculo cardíaco, MSC derivadas de líquido sinovial, MSC de cordón umbilical y otros tipos de células que pueden identificarse por un experto en la materia a la luz de la presente memoria descriptiva.

15 La proliferación de células madre de acuerdo con la presente invención es reversible, permitiendo que se induzcan estados alternos de inactividad y proliferación en una célula. Por ejemplo, los métodos de la presente invención pueden usarse para inducir y mantener la inactividad en una célula madre, por ejemplo poniendo en contacto la célula madre con un material que comprende compuestos que se unen con integrinas en la superficie celular y que tienen elasticidad aparente para la célula aproximadamente igual que la elasticidad del microambiente *in vivo* de la célula. Entonces puede inducirse proliferación en la célula poniendo en contacto la célula con un material que comprende compuestos que se unen con integrinas y que tienen elasticidad aparente para la célula sustancialmente menor que la elasticidad del microambiente *in vivo* de la célula. Entonces puede inducirse inactividad y mantenerse poniendo el contacto las células descendientes resultantes con un material que incluye compuestos de unión a integrina y que tiene elasticidad aparente para las células aproximadamente igual que el microambiente *in vivo* de las células.

20 En otra realización, se induce proliferación de células madre en un estado inactivo de acuerdo con un método de la presente invención. Después puede inducirse que estas células inactivas proliferen, como se ha descrito anteriormente.

25 La presente invención proporciona además métodos para inducir diferenciación de una célula madre somática en la que la actividad biológica se está manteniendo y se ha inducido inactividad o se mantiene de acuerdo con los métodos de la presente invención. Las realizaciones de este aspecto de la presente invención incluyen la etapa de poner en contacto dichas células con un material de diferenciación que comprende estímulos químicos seleccionados para estimular la diferenciación de las células a un tipo celular predeterminado y proporcionar a las células un material nutriente de células diferenciadas para mantener la actividad biológica de las células con diferenciación estimulada. En algunas realizaciones, la etapa de contacto puede precederse de una etapa que comprende inducir (o permitir) la proliferación, por ejemplo *ex vivo* de la célula madre somática poniendo en contacto la célula madre con un material que tienen elasticidad menor que la elasticidad del microambiente natural de la célula diana de diferenciación pretendida.

30 Puede inducirse diferenciación en células madre inactivas o proliferativas mantenidas en actividad biológica de acuerdo con la presente invención, usando métodos conocidos o evidentes para los expertos en la materia a la luz de la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, si la célula madre es una célula madre mesenquimal derivada de médula ósea humana, puede efectuarse diferenciación de la célula en adipocitos poniendo en contacto la célula con un medio adipogénico (como se realiza en el Ejemplo 1) en un sustrato con una elasticidad de aproximadamente 250 Pa, como se describe en detalle en la presente memoria descriptiva. Usando información que puede obtenerse de o como se describe en la presente memoria descriptiva con respecto a la reología de diversos tipos tisulares así como el medio de diferenciación para usar para inducir que las células madre se diferencien en diversos tipos de células, resultaría evidente para los expertos en la materia que pueden usarse métodos de la presente invención para inducir que una célula madre mesenquimal derivada de médula ósea humana se diferencie en uno o más de al menos los siguientes tipos celulares: osteoblastos, condrocitos, miocitos, adipocitos, células de islotes beta pancreáticos y células neuronales. Más en general, usando información sobre reología de diversos tipos tisulares y medios de diferenciación usados para inducir diferenciación de diversos tipos de células madre en diversos tipos de células, resultaría fácilmente evidente para los expertos en la materia inducir diferenciación, en cualquiera de los tipos de células madre identificados en la presente memoria descriptiva, en uno o más de un osteoblasto, un condrocito, un miocito, un adipocito, una célula de islote beta pancreático, una célula neuronal u otro tipo celular.

En realizaciones de este aspecto de la invención, las células diferenciadas se ponen en contacto con un medio que incluye nutrientes para mantener la actividad biológica de las células. Por ejemplo, si se usa un método de la presente invención para inducir que una célula madre mesenquimal derivada de médula ósea humana se diferencie en adipocitos, los adipocitos resultantes pueden ponerse en contacto con un medio nutriente para mantener su actividad biológica. El medio nutriente puede comprender DMEM (glucosa baja), suero bovino fetal e insulina. Otros medios nutrientes, y métodos para poner en contacto células diferenciadas con ellos, resultarán evidentes para los expertos en la materia a la luz de la presente memoria descriptiva.

También se describe en el presente documento un sistema artificial para inducir o mantener la inactividad y la integridad biológica sostenible de una célula madre somática. En realizaciones, el sistema incluye una sustancia de ligando de material extracelular (ECM) para poner en contacto una célula madre, un material sustrato unido a la sustancia de ligando de ECM y un medio para proporcionar nutrientes a la célula madre y mantener su actividad biológica. La sustancia de ligando de ECM, cuando se une al material de sustrato, tiene elasticidad similar a la elasticidad del material predominante *in vivo* en el microambiente biológico de una célula madre *in vivo* del mismo tipo. Las realizaciones del sistema pueden adaptarse para inducir inactividad en cualquiera de los tipos celulares en los que puede inducirse inactividad de acuerdo con los métodos de la invención descritos en la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, pueden adaptarse realizaciones del sistema para inducir inactividad en una célula madre somática o una célula madre embrionaria, una célula madre humana o una célula madre animal, una célula madre somática mesenquimal, (MSC), una MSC derivada de médula ósea, una célula madre renal, una célula madre derivada hepática, una MSC derivada de músculo esquelético, una MSC derivada de hueso, una MSC de pulpa dental, una MSC derivada de músculo cardiaco, una MSC derivada de líquido sinovial o una MSC del cordón umbilical.

En realizaciones, cuando la sustancia de ligando de ECM se une con el sustrato y entra en contacto con una célula madre, el material ECM se une con integrinas en la superficie de la célula madre de manera que induzca que la célula madre entre en inactividad, como se describe en detalle en la presente memoria descriptiva.

En las realizaciones de dicho sistema, puede haber un material de enlace que una el material de ligando de ECM con el material sustrato. Por ejemplo, cuando el material sustrato comprende un gel de poliacrilamida y el ECM comprende una mezcla de colágeno- fibronectina, el material de enlace puede ser NHS, incluyendo específicamente N-hidroxisuccinimida éster de ácido acrílico. Dependiendo de la naturaleza del material sustrato y el material extracelular, los expertos en la materia pueden determinar fácilmente materiales de enlace, que también puede caracterizarse como agentes de reticulación, para usar para enlazar el material sustrato y el ECM en diversas realizaciones de sistemas de la presente divulgación.

En realizaciones, cuando la capa de ligando de ECM se acopla al sustrato, la capa de ligando de ECM tiene elasticidad evidente para la célula madre sustancialmente similar a la elasticidad del material predominante en el microambiente biológico de una célula madre *in vivo* del mismo tipo que la célula madre que entra en contacto con la capa de ligando de ECM. Esta elasticidad aparente de la capa de ligando de ECM puede ser independiente de, casi independiente de o dependiente de la elasticidad del sustrato. En realizaciones, la elasticidad del sustrato es sustancialmente similar a la elasticidad del material predominante en el microambiente biológico de una célula madre *in vivo* del mismo tipo que la célula madre que entra en contacto con la capa de ligando de ECM, y la capa de ligando de ECM presenta a la célula madre sustancialmente la misma elasticidad que la elasticidad del sustrato con el que se acopla.

El sistema artificial descrito en el presente documento puede implementarse usando una diversidad de estructuras. En realizaciones, el material del sustrato forma una matriz, y el ECM se dispersa en la matriz. En realizaciones, un material de enlace también puede dispersarse en la matriz del sustrato para enlazar el material de la matriz de sustrato con el ECM. Por ejemplo, de acuerdo con una realización, una mezcla 5:1 de colágeno derivado de colas de rata (0,5 mg/ml) y fibronectina derivada de seres humanos (0,1 mg/ml), y un reticulador de N-hidroxisuccinimida éster de ácido acrílico (NHS), se dispersan en un gel de poliacrilamida. El gel se formula de modo que la elasticidad de la estructura sea de aproximadamente 250 Pa. Cuando se ponen en contacto MSC derivadas de médula ósea con la estructura de poliacrilamida-NHS-fibronectina-colágeno, se induce que entren en inactividad. Cuando las MSC que entran en contacto con la estructura también están provistas de material nutriente adecuado, su actividad biológica en un estado inactivo se mantiene.

En realizaciones, el material sustrato forma una capa, y el ECM forma una capa unida, directa o indirectamente, con la capa de sustrato. En otras realizaciones, el material de enlace forma una capa de enlace que enlaza la capa de ligando de ECM con la capa de sustrato. La capa de enlace puede actuar para presentar la elasticidad del sustrato a la capa de ligando de ECM de manera que permita que la capa de ligando de ECM presente esa elasticidad a la célula madre en la que se va a inducir inactividad. En una realización, la capa de enlace incluye composiciones de reticulación apropiadas y otros materiales que cumplen estas funciones. Por ejemplo, la capa de acoplamiento puede comprender NHS o, en realizaciones específicas, N- hidroxisuccinimida éster de ácido acrílico.

En realizaciones, el material de sustrato es un gel de poliacrilamida. Como se conoce en la técnica, la elasticidad de geles de poliacrilamida puede ajustarse cambiando las concentraciones de acrilamida y bisacrilamida en el gel. Resultaría evidente para los expertos en la materia, a la luz de la presente memoria descriptiva, cómo preparar



poliacrilamida u otros geles o materiales de sustrato para su uso en los sistemas de la presente invención.

5 Como resulta evidente adicionalmente a la luz de la presente memoria descriptiva, las realizaciones pueden utilizar otras estructuras. Por ejemplo, puede crearse una estructura casi tridimensional sembrando células madre en una capa de ECM como se ha descrito anteriormente, dejando las células reposar sobre la capa de ECM sumergiendo el sistema con células en medio, y colocando en las células otra capa de ECM con elasticidad aparente apropiada, como se describe adicionalmente en el Ejemplo 1.

10 En otra realización, una ventaja de los métodos de la presente invención es la resistencia de la matriz de gel o gel a degradación proteolítica. En otra realización, una ventaja es la resistencia a la remodelación activa por las células. En otra realización, una ventaja es la resistencia de la fibrina heterotérmica (por ejemplo salmón) a proteasas secretadas por neuronas de mamífero en comparación con fibrina de mamífero (por ejemplo humana o bovina). En otra realización, una ventaja es la menor incidencia de transferencia de enfermedad infecciosa de fibrina heterotérmica (por ejemplo, salmón) en comparación con fibrina de mamífero (por ejemplo humana o bovina). Cada posibilidad representa otra realización de la presente invención.

15 En otra realización, la célula diana de métodos de la presente invención es una MSC inmortalizada.

20 También se describe en el presente documento un método para inducir la detención de crecimiento de una MSC inmortalizada, que comprende la etapa de cultivar la MSC inmortalizada en un gel o una matriz de gel de métodos de la presente invención, induciendo de este modo la detención del crecimiento de una MSC inmortalizada. En otra realización, se proporciona en el presente documento un método para inhibir el crecimiento de una población de MSC inmortalizada, que comprende la etapa de cultivar la MSC inmortalizada en un gel o una matriz de gel de métodos de la presente invención, inhibiendo de este modo el crecimiento de una población de MSC inmortalizada. Cada posibilidad representa una realización distinta.

25 En otra realización, la célula diana de métodos de la presente invención es una célula transformada. En otra realización, la célula transformada es una célula de melanoma. En otra realización, la célula transformada es cualquier otro tipo de célula transformada conocida en la técnica. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

30 Como se proporciona en el presente documento, las células M2 mostraron un mayor tamaño y poblaciones celulares mayores en sustratos más rígidos. En otra realización, una población celular aumentada es un resultado del crecimiento aumentado de las células en sustratos rígidos. En otra realización, una población aumentada se debe a la muerte aumentada de células en sustratos blandos. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

35 También se describe en el presente documento un método para inducir la detención del crecimiento de una célula transformada, que comprende la etapa de cultivar la célula transformada en un gel o una matriz de gel de métodos de la presente invención, induciendo de este modo la detención del crecimiento de una célula transformada. En otra realización, se proporciona en el presente documento un método para inhibir el crecimiento de una población de células transformadas, que comprende la etapa de cultivar la célula transformada en un gel o una matriz de gel de métodos de la presente invención, inhibiendo de este modo el crecimiento de una población de células transformadas. Cada posibilidad representa una realización distinta.

40 En otra realización, un sustrato blando de métodos de la presente invención da como resultado un aumento en la forma unida a GDP inactiva de una proteína GTP en las células diana. En otra realización, la proteína GTP es Rho. En otra realización, la proteína GTP es Rac. En otra realización, la proteína GTP es Cdc42. En otra realización, la proteína GTP es cualquier otra proteína GTP conocida en la técnica. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

45 En otra realización, el miembro de la familia Rho señala mediante la formación de adhesiones focales. En otra realización, la activación de Rho inhibe la expresión de  $p21^{WAF1/c1p1}$ . En otra realización, la inhibición de  $p21^{WAF1/c1p1}$  activa las quinasas dependientes de ciclina (CDK). En otra realización, la activación de Rho induce la regulación negativa y degradación de  $p27^{K1p1}$ , otro inhibidor de CDK. En otra realización, la activación de Rho induce ROCK, dando como resultado la activación de la ruta Ras-Raf-MEK-ERK. En otra realización, esta ruta induce transcripción de ciclina D1 mediada por Ras. En otra realización, esto induce la progresión de fase G1. En conjunto, se mostró que la activación de Rho conducía a progresión de fase G1. En otra realización, la activación de Rac o Cdc42 regula positivamente ciclina E1 y ciclina D1, dando como resultado progresión de fase G1. En otra realización, la activación de una proteína de unión a GTP pequeña de familia Rho da como resultado la transducción de señal para potenciar la progresión del ciclo celular. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

50 En otra realización, un sustrato blando de métodos de la presente invención reduce la contractilidad del sistema de actomiosina de la célula diana. En otra realización, esto induce que las células diana cesen la proliferación. En otra realización, esto induce que las células diana se hagan competentes para estímulos adicionales para reiniciar la proliferación. En otra realización, esto induce que las células diana sean competentes para estímulos adicionales

para comprometerse a diferenciación terminal. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

5 En otra realización, un sustrato blando de métodos de la presente invención induce la activación de actomiosina. En otra realización, el sustrato blando induce actomiosina regulada por Rho. En otra realización, el sustrato blando induce miosina II. En otra realización, el sustrato blando induce miosina II regulada por Rho. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

10 En otra realización, una composición de métodos de la presente invención comprende además un activador de un miembro de la familia Rho. En otra realización, la composición comprende además un inhibidor de un miembro de la familia de Rho. En otra realización, el miembro de la familia Rho es Rho. En otra realización, el miembro de la familia Rho es Rac. En otra realización, el miembro de la familia Rho es Cdc42. En otra realización, el miembro de la familia Rho es cualquier otro miembro de la familia Rho conocida en la técnica. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención. En otra realización, la composición comprende además un activador de actomiosina. En otra realización, la composición comprende además un inhibidor de actomiosina. En otra realización, la composición comprende además un activador de miosina II. En otra realización, la composición comprende además un inhibidor de miosina II. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

20 Se conocen bien en la técnica métodos para polimerizar geles de acrilamida. En otra realización, se añaden 1,5 µl de TEMED (FisherBiotech CAS n.º 110189) y 5 µl de persulfato de amonio 10 % con la cantidad apropiada de H<sub>2</sub>O para producir un volumen final de 1.000 µl, la solución se pipetea en un cubreobjetos, y se coloca un cubreobjetos superior sobre la solución, después se desprende 10 minutos más tarde. Cada método representa una realización distinta de la presente invención.

25 En otra realización, para reticular proteínas de adhesión en el gel o la matriz de gel, se utiliza un reticulador heterobifuncional. En otra realización, el agente de reticulación heterobifuncional es sulfo-SANPAH (sulfosuccinimidil6(4'-azido-2'-nitrofenil-amino)hexanoato, Pierce n.º 22589). En otra realización, el reticulador heterobifuncional es cualquier otro reticulador heterobifuncional conocido en la técnica. En otra realización, sulfo-SANPAH se usa de la siguiente manera. Se disuelve sulfo-SANPAH 1 mg/ml en H<sub>2</sub>O, y se pipetea 200 µl de esta solución en la superficie del gel. El gel de poli(acrilamida) se coloca después a 15,24 cm bajo una lámpara ultravioleta y se irradia durante 10 min. Se lava después tres veces cada una con 3 ml de HEPES 200 mM, pH 8,6. Después de aspirarse la última solución de HEPES, se pipetea 200 µl de una solución de fibronectina de pez 0,14 mg/ml (Sea Run Holdings, South Freeport, ME) o colágeno de tipo I 0,14 mg/ml sobre el gel de poli(acrilamida). La placa multipocillo que aloja los geles se incuba después a 5 °C durante 4 h. Cada método representa una realización distinta de la presente invención.

35 Puede proporcionarse un kit que comprende para ensamblar un sistema como se ha descrito anteriormente o para llevar a cabo de otro modo los métodos de la presente invención. En una realización, dicho kit incluye como componentes separados: (1) un sustrato, o materiales para preparar un sustrato; (2) opcionalmente materiales para preparar y/o aplicar una capa de recubrimiento; y (3) materiales para preparar y/o aplicar material de ligando de ECM para formar una capa de ligando de ECM. El componente del sustrato puede, por ejemplo, comprender un gel de poli(acrilamida) de una elasticidad predeterminada, un gel de poli(acrilamida) con materiales para ajustar la elasticidad del gel hasta una elasticidad predeterminada o intervalo de elasticidades, o materiales para preparar un gel u otro sustrato adecuado con la elasticidad deseada. En realizaciones, el kit incluye un dispositivo para montar o sostener el gel para facilitar la aplicación de la capa de ligando de ECM y opcionalmente una capa de acoplamiento para acoplar el sustrato a la capa de ligando de ECM. Como resulta evidente para los expertos en la materia a la luz de la presente memoria descriptiva, pueden combinarse diversos componentes de los kits descritos en el presente documento para facilitar el almacenamiento, el envío y el ensamblaje de los kits.

50 Las realizaciones de dicho kit también pueden incluir materiales para preparar y/o aplicar la capa de ligando de ECM. Por ejemplo, el kit puede incluir material de ligando de ECM para aplicación directa al sustrato. En otras realizaciones, el kit puede incluir componentes individuales o ingredientes del material de la capa de ligando de ECM, con instrucciones para prepararlo y aplicarlo a los otros componentes del kit. Opcionalmente, el kit puede incluir materiales e instrucciones para ensamblar y aplicar una capa de acoplamiento para acoplar el sustrato a la capa de ligando de ECM. En una realización específica, un kit de un sistema descrito del presente documento para inducir inactividad en una MSC derivada de médula ósea humana incluye lo siguiente:

- 60 (a) una placa de Petri de vidrio (u otro aparato para soportar el sustrato y contener el resto de los componentes);
- (b) materiales para preparar un gel de poli(acrilamida) con aproximadamente 250 Pa de dureza para actuar como el sustrato, incluyendo cantidades apropiadas de acrilamida y bisacrilamida;
- 65 (c) reticulador de éster de N-hidroxisuccinimida de ácido acrílico (NHS) para aplicar al gel para formar una capa de acoplamiento; y

(d) materiales para preparar una capa de ligando de ECM, incluyendo los materiales identificados en el Ejemplo 1, para preparar un material extracelular de fibronectina-colágeno 1:5.

5 En una realización, un kit de la presente divulgación comprende un gel de poliacrilamida formulado con una elasticidad para inducir inactividad en células madre de un tipo específico; una solución que incluye composiciones de reticulación para aplicación al gel; material extracelular formulado para unirse con integrinas en la superficie del tipo de células especificado; y, opcionalmente, material nutriente adecuado (que también puede prepararse por los usuarios) para inducir inactividad en las células.

10 En algunas realizaciones del kit, el kit comprende una capa de material que proporciona tanto elasticidad como ligando de ECM. En otra realización, el kit puede comprender las siguientes tres capas de materiales:

a) un sustrato de gel que confiere elasticidad al sistema;

15 b) ligandos de ECM; y

c) reticuladores que conectan ligandos de ECM con el sustrato.

20 En las realizaciones de kits de la presente divulgación, los componentes del kit se colocan en un receptáculo tal como una bolsa o envase de plástico que contiene solución salina tamponada con fosfato (PBS). En algunas realizaciones, el receptáculo también puede contener conservantes tales como azida sódica. Los componentes pueden hidratarse en el kit, por ejemplo, durante el almacenamiento. En algunas realizaciones, el receptáculo se sella y/o se protege con armazones apropiados para evitar el daño al sistema. El kit puede enviarse a baja temperatura, tal como aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C.

25 En las realizaciones de kits de la presente divulgación, los usuarios pueden abrir el receptáculo y colocar los componentes del kit en un material apropiado, tal como una placa de cultivo tisular. Los usuarios también pueden retirar cualquier material duro sobre los componentes para exponer los ligandos de ECM y lavar los componentes con un tampón tal como PBS. Los usuarios pueden después sembrar células en el sistema poniendo una suspensión celular que comprende células, medio y suero, según sea necesario.

30 Los métodos de la presente invención pueden practicarse *in vivo* así como *ex vivo*. Dichos sistemas pueden incluir, por ejemplo, estructuras porosas para inserción en tejidos específicos o el sistema circulatorio para mantener una célula madre en inactividad dentro del cuerpo. Por ejemplo, pueden dispersarse células madre, ECM correspondientes y, opcionalmente, material de enlace, en una matriz polimérica que tiene elasticidad apropiada evidente para las células madre para inducir o mantener la inactividad, y que también tiene suficiente porosidad para permitir que los nutrientes *in vivo* alcancen la célula y permitir que las proteínas y otros factores expresados por la célula dejen la matriz. Otras realizaciones pueden incluir casetes u otros dispositivos que inducen o mantienen inactividad de células madre, y que pueden implantarse en un hospedador.

35 También se describe en el presente documento una célula madre inactiva mantenida en actividad biológica *ex vivo*. Los ejemplos de dicha célula madre incluyen una célula madre somática o una célula madre embrionaria, una célula madre humana o una célula madre animal, una célula madre mesenquimal (MSC), MSC derivadas de médula ósea, una célula madre renal, una célula madre derivada hepática, una MSC derivada de músculo esquelético, una MSC derivada de hueso, una MSC de pulpa dental, una MSC derivada de músculo cardíaco, una MSC derivada de líquido sinovial o una MSC de cordón umbilical. En realizaciones, los métodos de la presente invención se usan para inducir o mantener una célula madre en un estado inactivo, y para mantener la actividad biológica de dichas células madre inactivas.

40 En consecuencia, también se describe en el presente documento un aparato para modular el crecimiento de una célula madre mesenquimal que comprende: una matriz de gel que tiene una rigidez en el intervalo de 150-750 Pa; y un medio de inducción de adipocitos, en el que dicho gel o dicha matriz de gel se recubre con un colágeno de tipo 1, una fibronectina o una combinación de los mismos.

50 En otras realizaciones, los geles y matrices de gel de cualquiera de los métodos descritos anteriormente tienen cualquiera de las características de un gel o una matriz de gel de métodos de la presente invención. Cada característica representa una realización distinta de la presente invención.

60 Sección de detalles experimentales

Ejemplo 1: Medición de la rigidez de diversos tejidos y preparación de geles de poliacrilamida que se aproximan a las rigideces de los tejidos

65 Materiales y métodos experimentales

Preparación de geles de poliacrilamida

5 Se prepararon soluciones de acrilamida y bisacrilamida (Fisher Biotech, Loughborough, Leicestershire, Reino Unido) para contener una masa polimérica constante de 7,5 % y concentraciones de bisacrilamida de 0,01 %, 0,03 % o 0,3 % para alterar la rigidez. Se prepararon acrilamida, bisacrilamida, persulfato de amonio y N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina usados como un ejemplo de "geles blandos" y referidos como tales o 7500 Pa (en el presente documento usado como un ejemplo de "geles rígidos" y referidos como tales); los geles blandos imitan la rigidez de la médula ósea y tejidos grasos.

Tabla 1. Rigidez de tejidos, se obtuvieron tejidos de ratas de tres ratas Sprague-Dawley.

Tejido	Rigidez (Pa)
Médula ósea bovina	225 ± 25
Grasa subcutánea de rata	157 ± 36
Grasa visceral de rata	130 ± 40
Hígado de rata	403 ± 28
Músculo esquelético de rata	2251 ± 166

10 Por lo tanto, se prepararon geles de poliacrilamida que imitan la rigidez del tejido biológico.

Ejemplo 2: Forma celular y estructura de F-actina de hMSC en geles blandos y rígidos

Materiales y métodos experimentales

15 Se sembraron de forma dispersa hMSC en geles rígidos o geles blandos recubiertos con colágeno de tipo 1 y fibronectina. Las células se incubaron durante 24 horas en DMEM + suero de ternero fetal al 10 %, se fijaron y se tiñeron con faloidina Alexa Fluor 488.

20 Resultados

Se investigó el efecto de la rigidez de la matriz extracelular en la forma y la estructura de F-actina de hMSC (células madre mesenquimales humanas). Las células se incubaron en presencia de suero en matrices con diversas rigideces durante 24 horas para permitir la adherencia y proliferación. Las hMSC sembradas en geles rígidos o vidrio adoptaron una forma de huso y mostraron fibras de tensión y F-actina cortical (como se muestra por tinción con faloidina Alexa Fluor 488), mientras que las células sembradas en geles blandos mostraron una apariencia redondeada, carecían de fibras de tensión y contenían agregados de F-actina (Figura 1B-C).

Por lo tanto, las hMSC detectan la rigidez de la matriz extracelular, lo que influye en su forma y estructura de F-actina.

Ejemplo 3: Inhibición de la proliferación de hMSC en geles blandos.

Materiales y métodos experimentales

35 Se incubaron hMSC con BrdU (Invitrogen, Carlsbad, CA) durante una noche en presencia de suero. Las células se fijaron y se inmunotiñeron para BrdU (Invitrogen). Se contaron más de 50 células tres veces en campos elegidos aleatoriamente.

40 Resultados

Se midió la incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina 5'-trifosfato (BrdU) en hMSC como un marcador de la progresión del ciclo celular (Figura 2). Se sembraron células de forma dispersa en geles blandos, geles rígidos o superficies de vidrio, todos las cuales se recubrieron con colágeno de tipo 1 y fibronectina. Como control, también se prepararon células confluyentes en superficie de vidrio. Como se esperaba, hMSC sembradas de forma dispersa en superficies de vidrio incorporaron eficazmente BrdU, lo que indicaba un alto nivel de proliferación. Cuando las células fueron confluyentes en superficie de vidrio, muy pocas hMSC incorporaron BrdU debido a una inhibición de contacto. El 42 % de hMSC en geles rígidos incorporaron BrdU, lo que indicaba que estaba proliferando una gran población de células, aunque significativamente menos que la de células sembradas de forma dispersa en una superficie de vidrio. Por otro lado, ninguna hMSC en geles blandos incorporó BrdU, incluso aunque las células eran viables como se evaluó por falta de tinción de azul de tripano. Además, la incubación continuada de hMSC sembradas de forma dispersa en matrices produjo una densidad celular diferente dependiendo de la rigidez de matrices con mayor densidad en matrices más rígidas.

55 Por lo tanto, las matrices blandas inhiben la proliferación de hMSC incluso en presencia de suero.

Ejemplo 4: hMSC en geles blandos son competentes para diferenciarse en adipocitos

Materiales y métodos experimentales

5 Estudios de diferenciación de adipocitos

Se sembraron hMSC de suspensiones celulares en placas de cultivo tisular de 96 pocillos recubiertas con colágeno de tipo 1 más fibronectina a una densidad de  $3,5 \times 10^4$  células/pocillo. Después de incubar células en DMEM que contenía FCS 10 % (medio de cultivo, "GM") durante 24 horas, se indujo la diferenciación de las células en adipocitos incubando durante 3 días (2 ciclos celulares) en medio de inducción adipogénica (AIM) (GM, dexametasona 1  $\mu$ M, indometacina 200  $\mu$ M, insulina 10  $\mu$ g/ml y metilisobutilxantina 0,5 mM) manteniendo después en medio de mantenimiento adipogénico (GM, insulina 10  $\mu$ g/ml). 8 días después de cambiar a AIM, se evaluó la diferenciación de adipocitos bien por tinción con Oil Red O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) o bien por inmunotinción con respecto a PPAR $\gamma$ 2 usando anticuerpos anti PPAR $\gamma$ 2. Se contaron más de 50 células tres veces en campos elegidos aleatoriamente. Se proporcionaron anticuerpos anti-PPAR $\gamma$ 2 por Dr. Mitchell A. Lazar, Universidad de Pensilvania.

Resultados

20 Para confirmar la viabilidad de hMSC en geles blandos, se midió su capacidad para diferenciarse en adipocitos de dos maneras; (a) inmunotinción de receptores activados por proliferadores de peroxisoma gamma 2 (PPAR $\gamma$ 2), uno de los factores de transcripción claves para la adipogénesis, y (b) tinción con Oil Red O para medir la acumulación de lípidos. Cuando se indujo la diferenciación en adipocitos de hMSC confluyentes en una superficie de vidrio mediante una mezcla de dexametasona, indometacina, 3-isobutil-1-metil-xantina e insulina en medio que contiene suero de ternero fetal, aproximadamente el 40 % de las células mostraron un fenotipo de adipocito (Figura 3A). Por el contrario, en geles blandos con inducción, la tasa de diferenciación alcanzó más del 80 %, significativamente mayor que la de vidrio; sin inducción, no se observó ninguna diferenciación de adipocitos. Además, las hMSC sembradas de forma dispersa en vidrio mostraron un alto nivel de proliferación (Figura 2) y no se diferenciaron en adipocitos (Figura 3B). Estos resultados indican además que las hMSC podrían tener que dejar el ciclo celular como un requisito previo para la diferenciación terminal.

Por lo tanto, las hMSC sembradas de forma dispersa en geles blandos son completamente viables y son competentes para la diferenciación de adipocitos.

35 Ejemplo 5: Estructura de F-actina en astrocitos sembrados en geles rígidos o blandos

Para caracterizar adicionalmente y cuantificar la respuesta de células a la rigidez de la matriz, también se ensayó el efecto de la rigidez de la matriz extracelular en la estructura de F-actina en astrocitos. Se aislaron astrocitos primarios de embriones de ratas Sprague-Dawley de la siguiente manera: se retiraron embriones (E17-E19) por cesárea de una rata Sprague-Dawley con embarazo programado y se retiraron las cortezas. Se digirió el tejido en tripsina/DNasa a 37 °C, se centrifugó (1000 g x 5 min), y se filtró para derivar a una suspensión celular. Para cultivos que contenían tanto neuronas como células gliales, las células se sembraron directamente en placas con sustratos. Se mantuvieron cultivos de astrocitos primarios durante 14 días en cultivo con una serie de tripsinizaciones para retirar neuronas: los cultivos usados para experimentos fueron > 98 % de astrocitos como se determinó por inmunocitoquímica de GFAP. Las células se cultivaron en una incubadora a 37 °C y CO<sub>2</sub> 5 % en medio de Eagle modificado por Dulbecco (BioWhittaker, East Rutherford, NJ) complementado con F12 de Ham (Sigma) y suero bovino fetal al 5 % (Hyclone, Logan, UT) durante 7 días seguido de 5 días adicionales de cultivo en Neurobasal (Gibco, Carlsbad, CA) también complementado con suero bovino fetal al 5 %, 1-glutamina 2 mM, estreptomycin 50  $\mu$ g/ml y penicilina 50 unidades/ml.

50 Las células se incubaron en presencia de suero en geles de poliacrilamida rígidos (11 kPa) o blandos (150 Pa) durante 48 horas para permitir la adherencia y proliferación. Las células se fijaron, y se visualizó la estructura de F-actina con faloidina. Como se muestra en la Figura 4, se observaron fibras de tensión y F-actina cortical en astrocitos sembrados en geles rígidos. Por el contrario, en astrocitos sembrados en geles blandos, no estaban presentes fibras de tensión y solamente se observaron carcasas de actina cortical. Por lo tanto, los astrocitos en geles blandos detectaron la flexibilidad de la matriz y en consecuencia no mostraron fibras de tensión.

Ejemplo 6: Bajo nivel de carga de GTP RHO en astrocitos en geles blandos

60 Materiales y métodos experimentales

Ensayo de precipitación de rhoteguina  
Las células se lavaron con solución salina tamponada con Tris helada y se lisaron en tampón de RIPA (Tris 50 mM, pH 7,2, Triton X-100 1 %, desoxicolato sódico 0,5 %, SDS 0,1 %, NaCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, 10  $\mu$ g/ml de cada uno de leupeptina y aprotinina, y PMSF 1 mM). Se clarificaron lisados celulares por centrifugación a 13.000 x g a 4 °C durante 10 min, y se incubaron volúmenes iguales de lisados con perlas de GST-RBD (20  $\mu$ g) a 4 °C durante 45 min.

Las perlas se lavaron 4 veces con tampón B (tampón Tris que contiene Triton X-100 1 %, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, 10 mg/ml de cada uno de leupeptina y aprotinina y PMSF 0,1 mM). Se detectaron proteínas Rho unidas por transferencia de Western usando un anticuerpo monoclonal contra RhoA (Santa Cruz Biotechnology). Se realizó análisis densitométrico usando sistema de Alphamager™ (Alpha Innotech). La cantidad de Rho unido a RBD se normalizó con respecto a la cantidad total de Rho en lisados celulares para la comparación de la actividad de Rho (nivel de Rho unido a GTP) en muestras diferentes.

#### Resultados

Para determinar si la pérdida de fibras de tensión inducida por geles blandos en astrocitos está asociada o no con la inactivación de Rho, se sembraron astrocitos en geles de poli(acrilamida) con diversas rigideces y se incubaron en presencia de suero durante 48 horas. Se prepararon lisados celulares y se ensayó la carga de GTP de Rho usando GST-rhotequina y un ensayo de extracción de rhotequina. Se calculó la relación de Rho unido a GTP frente a total. Los astrocitos en geles blandos mostraron un bajo nivel de Rho unido a GTP (Figura 5), lo que indica atenuación de la actividad de Rho en astrocitos en una matriz blanda, que da como resultado la ausencia de fibras de tensión en las células.

#### Ejemplo 7: Células de melanoma modulan su proliferación, basándose en la rigidez en la matriz extracelular

##### Materiales y métodos experimentales

Se sembraron de forma dispersa células M2 en matrices de diversas rigideces recubiertas con una mezcla de colágeno de tipo 1 y fibronectina. Después de 24 horas de incubación, se midió el área celular delimitando los límites celulares. Se contaron más de 30 células 3 veces en campos elegidos aleatoriamente.

##### Resultados

Para ensayar si las células transformadas modulan su comportamiento de acuerdo con el nivel de rigidez en la matriz extracelular, se midió el efecto de la rigidez en la proliferación celular en líneas celulares de melanoma humano, denominadas células M2. Como se muestra en la Figura 6, las células M2 mostraron un mayor tamaño en sustratos más rígidos. Por lo tanto, las células M2 transformadas tienen una capacidad de modular su comportamiento (por ejemplo, proliferación celular) de acuerdo con las propiedades mecánicas de la matriz.

#### Ejemplo 8: Cantidad reducida de células de melanoma en geles blandos

Para determinar el efecto de la rigidez de la matriz en el tamaño de la población de células M2, se sembraron células M2 en geles blandos o rígidos (el mismo número en cada uno) y se recubrieron con una mezcla de colágeno de tipo 1 y fibronectina. Se evaluó la eficacia de la adherencia celular a cada sustrato después de 24 horas de incubación en presencia de suero, cuando se adhirieron completamente células M2 y proliferaron en ambos geles. Como se muestra en la Figura 7, no hubo diferencias significativas en el número de células adheridas entre geles blandos y rígidos, lo que indica que la rigidez de la matriz no afecta a la adherencia de células M2. Después de una incubación de 72 horas, aunque se adhirió el mismo número de células a cada sustrato (Figura 7), las 48 horas adicionales de incubación provocaron una población de células significativamente mayor en geles rígidos (Figura 8). No se observó ninguna diferencia observable en el número de células que flotaban en el medio entre geles blandos y rígidos después de 72 horas de incubación.

Estos resultados demuestran además métodos para cuantificar respuestas de hMSC a sustratos blandos.

#### Ejemplo 9: Uso de geles blandos para conservación a largo plazo de hMSC sin atenuar la viabilidad y la autorrenovación

##### Materiales y métodos experimentales

Se preparan geles de poli(acrilamida) blandos con G' de aproximadamente 200 Pa recubiertos con una mezcla de colágeno de tipo 1 y fibronectina en cubreobjetos de vidrio como se ha descrito para el Ejemplo 1. Se colocan geles de poli(acrilamida) en placas de 6 pocillos cubiertas con gel de agarosa 1 %, para evitar la adhesión celular fuera de geles de poli(acrilamida), o cubreobjetos de vidrio. Se siembran  $5 \times 10^4$  hMSC de pase 2 en geles de poli(acrilamida) blandos o directamente en placas de cultivo tisular de 6 pocillos recubiertas con colágeno de tipo 1 más fibronectina, y se incuban en DMEM complementado con suero de ternero fetal (FCS) 10 %. Se suspenden muestras de hMSC idénticas en DMEM que contiene FCS 10 % y dimetilsulfóxido (DMSO) 10 % y se mantienen congeladas en vapor de nitrógeno líquido de acuerdo con el protocolo convencional (Gordon SL *et al*, Cryobiology. Sep 2001; 43 (2): 182-7). Después de alcanzar 90 % de confluencia, las células que se habían sembrado directamente en placas de cultivo tisular se tripsinizan y se subcultivan en nuevas placas de cultivo tisular de 6 pocillos a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/pocillo. Las células en placas de cultivo tisular se mantienen hasta que alcanzan el pase 10. Las células sembradas en geles de poli(acrilamida) blandos se vuelven a alimentar con DMEM nuevo complementado con FCS 10 % dos veces cada 7 días. Cuando las hMSC mantenidas en placas de cultivo tisular alcanzan el pase 10, se

descongelan hMSC reservadas en vapor de nitrógeno líquido para generar una suspensión celular.

Resultados

5 Para determinar la viabilidad de hMSC sometidas a conservación a largo plazo en un estado inactivo en geles blandos, se almacenan hMSC en geles blandos hasta que las hMSC mantenidas en placas de cultivo tisular alcanzan el pase 10. La viabilidad de estas células se compara con células reservadas en vapor de nitrógeno líquido. Las células adheridas a geles blandos o placas de cultivo tisular se tripsinizan, mientras que las células almacenadas en nitrógeno líquido se descongelan, para generar una suspensión celular. La viabilidad se determina por tinción con azul de tripano de las suspensiones celulares. Por lo tanto, el almacenamiento en gel blando es un medio eficaz para mantener la viabilidad de las hMSC.

15 Para medir la potencia de proliferación de hMSC almacenadas en incubación a largo plazo en geles blandos, se preparan células que se han mantenido en geles blandos, en placas de cultivo tisular o se han mantenido congeladas en vapor de nitrógeno líquido, y se realiza un ensayo de incorporación de BrdU volviendo a sembrar células de cada fuente en placas de cultivo tisular recubiertas con colágeno de tipo 1 más fibronectina e incubando en presencia de suero y BrdU durante 12 horas. Las células se fijan y se inmunotiñen con respecto a BrdU incubando células con anticuerpos anti-BrdU (Invitrogen).

20 Ejemplo 10: Uso de geles blandos para conservación a largo plazo de hMSC sin atenuar la diferenciación

Materiales y métodos experimentales

*Ensayos de diferenciación de osteoblastos*

25 Se siembran suspensiones de hMSC de pase 10 en placas de cultivo tisular de 96 pocillos recubiertas con colágeno de tipo 1 más fibronectina a una densidad de  $10^3$  células/pocillo. Después de incubar células en GM durante 24 horas, se induce la diferenciación de las células en osteoblastos cambiando el medio a medio de inducción osteogénico (OIM) (GM, ácido ascórbico-2-fosfato 50  $\mu$ M, p-glicerofosfato 10 mM, y dexametasona 100 nM), cambiando el medio cada 3 días durante 3 semanas. Se evalúa la diferenciación de osteoblastos fijando las células con acetona/citrato y tiñendo con respecto a actividad fosfatasa alcalina con Fast Blue RR/naftol (Sigma-Aldorich, Kit n.º 85).

Resultados

35 A continuación, se mide la potencia de diferenciación de hMSC sometidas a conservación a largo plazo en un estado inactivo en geles blandos. Se tripsinizan hMSC almacenadas en geles blandos o placas de cultivo tisular para realizar suspensiones generadas; en paralelo, se preparan suspensiones celulares descongelando hMSC mantenidas congeladas en nitrógeno líquido. Se evalúa la diferenciación de adipocitos como se ha descrito para el Ejemplo 4.

40 En estudios adicionales, se mide la producción de adipocitos después de incubar hMSC directamente en el gel blando, sin sembrar previamente en placas de cultivo tisular y tripsinización.

45 En estudios adicionales, se mide la producción de osteoclastos en suspensiones celulares preparadas a partir de geles blandos, placas de cultivo tisular o almacenamiento congelado.

50 En estudios adicionales, se mide la producción de osteoclastos después de incubar hMSC directamente en el gel blando, sin sembrar previamente en placas de cultivo tisular y tripsinización.

Ejemplo 11: Implicación de proteínas de unión a GTP pequeñas de la familia Rho y sistema de actomiosina en la regulación del crecimiento de células madre por rigidez de la matriz

Materiales y métodos experimentales

*Ensayos de la familia de Rho*

55 Se preparan geles de poliacrilamida con G' de aproximadamente 200 Pa (geles blandos) y con G' de aproximadamente 7500 Pa (geles rígidos) en cubreobjetos de vidrio, y se recubren geles y cubreobjetos con una mezcla de colágeno de tipo 1 y fibronectina. Se colocan geles de poliacrilamida o cubreobjetos de vidrio en placas de 6 pocillos cubiertas con gel de agarosa al 1 % para evitar la adhesión celular fuera de los geles de poliacrilamida o cubreobjetos de vidrio. Se siembran  $5 \times 10^4$  hMSC en un gel de poliacrilamida o un cubreobjetos de vidrio, después se incuban en presencia de suero durante 24 horas. Las células se someten a un ensayo de precipitación para investigar el nivel de carga de GTP de Rho, Rac y Cdc42 usando su kit de ensayo de activación (Upstate Biotech, Charlottesville, VA).

*Transfección de células con formas de Rho dominantes negativas o constitutivamente activas*

Se clona ADNc para la GTPasa Rho candidata a partir de una biblioteca de ADNc de hígado de rata, y se introduce una mutación que crea una forma D/N o C/A de una proteína Rho (Qui RG *et al*, Proc Natl Acad Sci USA. 5 dic 1995; 92 (25): 11781-5; Lu X *et al*, Curr Biol. 1 dic 1996; 6 (12): 1677-84), y se añade una secuencia que codifica un marcador de myc a cada ADNc. Se crea adenovirus recombinante que expresa proteínas de la familia Rho mutantes y se usa para sobreexpresar las proteínas mutantes en hMSC.

Resultados

Para estudiar adicionalmente el papel de las proteínas de la familia Rho en la transmisión de información acerca de la matriz extracelular, se ensayan actividades de proteínas de la familia Rho en MSC cultivadas en geles blandos o rígidos. Se identifican proteínas de la familia Rho adicionales implicadas en la trasmisión de estas señales.

En experimentos adicionales, la forma dominante negativa (D/N) o la forma constitutivamente activa (C/A) de una proteína de la familia Rho de interés se sobreexpresa en hMSC. Se utiliza adenovirus recombinante que expresa LacZ como un control negativo. Se preparan hMSC de geles blandos, geles rígidos o cubreobjetos de vidrio, se incuban durante 24 horas, después se dejan no infectadas o infectadas con adenovirus que expresa LacZ o formas mutantes de proteínas de la familia Rho. Después de 36 horas de incubación, se añade BrdU al medio, y las células se incuban durante 12 horas adicionales en medio que contiene suero, después se fijan y se inmunotiñen con respecto a marcador de myc y BrdU usando anticuerpos anti myc (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) y anticuerpos anti BrdU (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se usa comparación del número de células positivas para tinción con BrdU entre células no infectadas y células infectadas con adenovirus LacZ para confirmar que la infección por adenovirus en sí misma no tiene efecto en el crecimiento de hMSC. El número de células positivas para incorporación de BrdU se compara con el número positivo para tinción con marcador de myc. La modulación negativa de la detención del crecimiento inducida por matriz blanda o promoción de crecimiento inducida por matriz rígida por formas C/A y D/N de proteínas de la familia Rho, respectivamente, indica implicación de la proteína de la familia Rho sobreexpresada en la regulación del crecimiento de hMSC por rigidez de matriz.

Ejemplo 12: determinación del papel de actomiosina en la regulación del crecimiento de células madre por rigidez de la matriz

Para estudiar el papel de la actomiosina en la regulación del crecimiento de hMSC en geles blandos antes de comprometerse a linajes celulares específicos, las hMSC se siembran en cubreobjetos de vidrio recubiertos con una mezcla de colágeno de tipo 1 y fibronectina durante 24 horas, después se incuban con BrdU en presencia o ausencia de 2,3-butanodiona monoxima (BDM) 20 mM, blebistatina 100  $\mu$ M o citocalasina D (CD) 0,25  $\mu$ M/ml durante 12 horas adicionales. A lo largo del experimento, las células se incuban en presencia de suero. Después de la incubación, las células se fijan y se inmunotiñen con respecto a BrdU. Se evalúa el efecto en el crecimiento de hMSC de la inhibición de miosina II por BDM o blebistatina, o la alteración de filamentos de actina por CD.

Ejemplo 13: crecimiento y diferenciación de hMSC en geles de fibrina tridimensionalesMateriales y métodos experimentales*Reparación y siembra de geles de fibrina*

Se rehidrata fibrinógeno de salmón (Searun Holdings, Freeport, ME) en H<sub>2</sub>O y se diluye hasta 3 (para gel blando) o 18 mg/ml (para gel rígido) en Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 y se polimerizan alícuotas de 400 microlitros ( $\mu$ l) con 2 unidades/ml de trombina de pescado (Searun Holdings) en pocillos de cultivo tisular. La rigidez de los geles de fibrina de salmón preparados de fibrinógeno 3 y 18 mg/ml es de 250 Pa y 2150 Pa, respectivamente. Se mezclan 10<sup>4</sup> hMSC con solución de fibrinógeno en DMEM que contiene FCS 10 % antes de la polimerización, en el que las células se incuban durante 24 horas.

Resultados

Se evalúa el análisis de proliferación de MSC en geles blandos y rígidos de fibrina incubando células durante 12 horas adicionales en presencia de suero y BrdU, seguido de fijación e inmunotinción para incorporación de BrdU.

Se evalúa la potencia de diferenciación de hMSC en geles de fibrina mediante la eficacia de diferenciación de adipocitos. Se induce la diferenciación de MSC en geles de fibrina en adipocitos cambiando el medio a Medio de Inducción Adipogénico ("AIM" DMEM + FBS 10 %, dexametasona 1 micromolar ( $\mu$ M), indometacina 200  $\mu$ M, insulina 10 microgramos ( $\mu$ g)/ml y metilisobutilxantina 0,5 mM) durante 3 días, manteniendo después las células en Medio de Mantenimiento Adipogénico (GM, insulina 10  $\mu$ g/ml). 8 días después de cambiar a Medio de Inducción Adipogénico, se evalúa la diferenciación de adipocitos bien por tinción con Oil Red O o bien por inmunotinción anti PPAR $\gamma$ 2. Se comparan los porcentajes de células positivas para tinción con Oil Red O o tinción con PPAR $\gamma$ 2 entre geles de fibrina blandos y rígidos.



En otros experimentos, se añaden inhibidores de proteasa a la matriz para prevenir o inhibir la degradación proteolítica u otra remodelación activa por las células.

Ejemplo 14: uso de hMSC de la presente invención para mantener la viabilidad de células madre hematopoyéticas

Se siembran suspensiones de MSC de pase 10 en placas de cultivo tisular de 96 pocillos recubiertas con colágeno de tipo 1 más fibronectina a una densidad de  $10^3$  células/pocillo. Después de incubar las células en GM durante 24 horas, las células se cultivan en presencia de un gel o una matriz blanda, como se ha descrito en los Ejemplos anteriores. Los cultivos de células madre mesenquimales resultantes se añaden después a cultivos de células madre hematopoyéticas para mantener la viabilidad de estas últimas células.

En estudios adicionales, se incuban hMSC directamente en el gel blando, sin siembra previa en placas de cultivo tisular y tripsinización.

Ejemplo 15: células madre mesenquimales derivadas de médula ósea humana (MSCS).

Sumario: se recubrieron geles de poliacrilamida de 250 Pa con una mezcla de colágeno de tipo 1 y fibronectina. El gel recubierto con colágeno y fibronectina tuvo una elasticidad que es similar a la de médula ósea y tejidos grasos. Cuando se sembraron de forma dispersa en estos geles, las MSC humanas detuvieron la progresión a través del ciclo celular a pesar de la presencia de suero. Sin embargo, cuando se acoplaron a un sustrato rígido, estas MSC humanas no proliferativas reentraron en el ciclo celular.

Las MSC humanas no proliferativas en geles de 250 Pa también fueron capaces de diferenciarse en adipocitos cuando se cultivaron en medio de inducción adipogénica y en osteoblastos cuando se transfirieron a un sustrato rígido y se incubaron con medio de inducción de osteoblastos. Estos resultados demuestran que las MSC humanas en geles de 250 Pa son inactivas pero también competentes para reanudar la proliferación o iniciar la diferenciación tras un estímulo apropiado.

Materiales y métodos

Materiales. Se obtuvieron células madre mesenquimales humanas derivadas de médula ósea de Cambrex (Walkersville, MD). Se obtuvieron polvos de acrilamida y bisacrilamida de Fisher Scientific (Pittsburgh, PA). Se obtuvo colágeno de tipo 1 de cola de rata de BD Bioscience (San Jose, CA). Se purificó fibronectina humana usando procedimientos conocidos en la técnica (Williams EC, Janmey PA, Ferry JD, *et al.*, "Conformational states of fibronectin. Effects of pH, ionic strength, and collagen binding", J Biol Chem. 1982; 257: 14973-14978). Se obtuvo Oil Red O (ORO) de Sigma (St. Louis, MO). Se obtuvo Alizarin Red S de Alfa Aesar (Ward Hill, MA). Se obtuvo reactivo de marcaje de BrdU de Zymed (San Francisco, CA). Se obtuvieron anticuerpos anti BrdU y DAPI de Invitrogen (Carlsbad, CA). Todos los otros productos químicos usados en este Ejemplo 1 fueron de uso analítico.

Cultivo celular. Antes de la siembra en geles, se mantuvieron células madre mesenquimales humanas derivadas de médula ósea (MSC) en un medio de cultivo (GM) que comprendía Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) con D-glucosa 1 g/l (DMEM bajo en glucosa), L-glutamina 0,3 mg/ml y piruvato sódico 100 mg/l y suero bovino fetal inactivado por calor 10 % en plástico de cultivo de tisular. Para diferenciación de adipocitos, las células se expusieron a dos ciclos de inducción química que consistían en 3 días en medio de inducción adipogénica (GM, dexametasona 1  $\mu$ M, indometacina 200  $\mu$ M, insulina 10  $\mu$ g/ml y 3-isobutil-1-metilxantina 0,5 mM) y 1 día en medio de mantenimiento adipogénico (GM e insulina 10  $\mu$ g/ml). Las células indiferenciadas se mantuvieron en GM y se realimentaron cada 3 días. Para diferenciación de osteoblastos, las células se incubaron con un medio de inducción de osteoblastos (GM, ácido ascórbico-2-fosfato 50  $\mu$ M,  $\beta$ -glicerofosfato 10 mM y dexametasona 100 nM) durante 24 días, en el que el medio se cambió 3-4 días. Las células se sembraron a una densidad de  $5 \times 10^4$  células por cada  $4,9 \text{ cm}^2$  en geles o  $1 \times 10^5$  células por cada  $4,9 \text{ cm}^2$  (confluentes) o  $1 \times 10^4$  células por cada  $4,9 \text{ cm}^2$  (dispersas) en vidrio.

Preparación y Caracterización de Geles. Se prepararon geles de poliacrilamida de 250 Pa y 7500 Pa usando procedimientos conocidos en la técnica con modificaciones menores, como se describe en Pelham, *et al.* (Pelham RJ, Jr., Wang Y., "Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility", Proc Natl Acad Sci U S A. 1997; 94: 13661-13665). Se prepararon soluciones de acrilamida 3,0 % y bisacrilamida 0,2 % (para gel de 250 Pa) o acrilamida 7,5 % y bisacrilamida 0,5 % (gel de 7500 Pa), respectivamente, en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (pH 7,4) hasta un volumen total de 500  $\mu$ l. Se inició la polimerización con N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina y persulfato de amonio. Se depositó una gota de 150  $\mu$ l en un cubreobjetos de vidrio de 25 mm previamente modificado con 3-aminopropiltrimetoxisilano y glutaraldehído. Se aplicaron 15  $\mu$ l de N-hidroxisuccinimida éster de ácido acrílico 2 % en tolueno a la gota y se colocó un cubreobjetos clorosilanizado de 25 mm sobre la gota y se retiró después de completarse la polimerización, y el gel resultante se iluminó con luz ultravioleta durante aproximadamente 10-15 minutos. Los geles se colocaron en una placa de cultivo tisular de poliestireno de seis pocillos y se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Las placas de seis pocillos se recubrieron previamente con un gel de agarosa 1 % para evitar la adhesión de células fuera de geles o cubreobjetos. El acrilato de N-succinimida sobre el gel se hizo reaccionar durante una hora con una mezcla de 0,1

mg/ml de colágeno de tipo 1 de cola de rata y fibronectina humana 0,02 mg/ml. Los geles se lavaron después 3 veces con PBS y se dejaron en PBS hasta que las células se sembraron en un periodo de 24 horas. Los cubreobjetos de vidrio se sumergieron en solución de colágeno de tipo 1 de cola de rata más fibronectina humana durante 1 hora para recubrir su superficie con ligandos de matriz extracelular.

Mediciones de reología. Para medir el módulo de cizalla dinámico ( $G'$ ) de geles de poli(acrilamida), se polimerizaron 500  $\mu$ l de solución monomérica entre dos placas paralelas de acero de 25 mm en una cámara de hidratación. El módulo de cizalla se calculó a partir de la tensión de cizalla en fase en un reómetro espectral de fluidos RFS III controlado por presión (Rheometrics, Piscataway, NJ) usando una tensión de cizalla oscilatoria del 2 % a una frecuencia de 10 radianes por segundo. El módulo de cizalla dinámico ( $G'$ ) se midió para tejidos animales relevantes. Los tejidos de rata se disecaron del animal y se mantuvieron hidratados en PBS durante no más de 1 hora antes de las mediciones. Se obtuvieron tejidos bovinos de un matadero comercial, se transportaron en hielo, se hidrataron y se calentaron a 37 °C antes de realizarse las mediciones. Se midieron los módulos de cizalla dinámicos ( $G'$ ) de muestras hidratadas de 8 mm de diámetro, 2 mm de grosor de tejido de rata y muestras hidratadas de 25 mm de diámetro, 2 mm de grosor de tejido bovino a 37 °C usando placas paralelas con geometrías que coincidían con las muestras y una tensión de cizalla oscilatoria del 2 % a una frecuencia de 10 radianes por segundo. Se midieron tres muestras de cada tejido.

Sistema de gel casi tridimensional. Se crearon sándwiches de sustrato que se diseñaron para imitar un ambiente tridimensional de células usando métodos descritos en Beningo, *et al.*, modificados para cambiar la elasticidad del sustrato, la composición de la capa de ECM y el peso usado para aproximar las células de forma estrecha al cubreobjetos, como se describe posteriormente (Beningo KA, Dembo M, Wang YL, "Responses of fibroblasts to anchorage of dorsal extracellular matrix receptors", Proc Natl Acad Sci USA. 2004; 101: 18024-18029). Las células se sembraron en un gel de 25 mm y se permitió que reposaran durante 48 horas. Se retiró el exceso de medio y se colocó un segundo cubreobjetos (con y sin gel de poli(acrilamida) de 250 Pa en la parte inferior) sobre el gel sembrado. La parte inferior del segundo cubreobjetos se recubrió con la mezcla de colágeno de tipo 1 y fibronectina descrita anteriormente. Para aproximar estrechamente las células a un segundo cubreobjetos, se colocó un peso de 35 gramos esterilizado sobre el sándwich durante 30 segundos. Después de retirarse el peso, el medio se reintrodujo, y las células se mantuvieron en los sándwiches durante 2 días. Se capturaron imágenes de las células inmediatamente antes de aplicar el cubreobjetos superior y también 2 días después.

Captura de imágenes. Se realizó inmunotinción usando procedimientos conocidos en la técnica (Funaki M, Randhawa P, Janmey PA, "Separation of insulin signaling into distinct GLUT4 translocation and activation steps", Mol Cell Biol. 2004; 24: 7567-7577). Se tiñeron vesículas ricas en ácidos grasos con ORO después de 2 ciclos de inducción adipogénica u 8 días en medio de cultivo, como se describe en Shao y Lazar. (Shao D, Lazar MA, "Peroxisome proliferator activated receptor gamma, CCAAT/enhancer-binding protein alpha, and cell cycle status regulate the commitment to adipocyte differentiation," J Biol Chem. 1997; 272: 21473-21478). Se tiñó la matriz extracelular rica en calcio con Alizarin Red S después de 24 días en medio de inducción de osteoblastos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se midió la incorporación de BrdU incubando las células en medio que contenía BrdU durante una noche. Las células se fijaron y se tiñeron con respecto a BrdU y DAPI de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En todos los casos, se capturaron imágenes de las células en un microscopio Leica DM-IRBE (Wetzlar, Alemania) con una cámara ORCA de Hamamatsu (Hamamatsu, Japón).

El área celular proyectada se midió usando imágenes de tinción con faloidina. Las imágenes se convirtieron a 8 bit y se determinaron umbrales. El tamaño de las partículas se analizó usando software Image J (NIH, Bethesda, MD). Las células también se tiñeron con DAPI para verificar que las células no se solapaban. Se contaron solamente células aisladas.

### Resultados

Se realizó ensayo reológico en médula ósea para determinar la elasticidad del gel apropiada para estudiar el papel de conformidad del sustrato en el mantenimiento de un depósito de MSC humanas en reposo. Como se muestra en la Tabla 3 posterior, la médula ósea bovina mostró un módulo de almacenamiento oscilatorio ( $G'$ ) de 220 Pa. El  $G'$  de tejidos grasos también se midió para investigar el papel de la rigidez del sustrato en la adipogénesis de MSC humana. Los tejidos adiposos de rata mostraron un  $G'$  ligeramente menor de aproximadamente 150 Pa. No hubo ninguna diferencia estadística entre el  $G'$  para grasa visceral y subcutánea en ratas. Se adoptó una solución de sustrato de poli(acrilamida) de acrilamida 3,0 % y bisacrilamida 0,1 % para imitar la elasticidad del ambiente natural de las células. Esta solución de poli(acrilamida) tiene un  $G'$  polimerizado de  $250 \pm 25$  Pa, que es similar a los valores de  $G'$  medidos de los tejidos de rata y bovinos. En algunos experimentos un segundo sustrato con un módulo de almacenamiento de  $7500 \pm 250$  Pa (similares a los del tejido muscular) actuó como un control (Engler AJ, Griffin MA, Sen S, *et al.*, "Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments", J Cell Biol. 2004; 166: 877-887).

Tabla 3

Especie	Bovina	Rata	Rata
Tejido	Médula Ósea	Grasa Visceral	Grasa Subcutánea
Elasticidad (media ± DT)	220 ± 50 Pa	130 ± 70 Pa	160 ± 70 Pa

Las Figuras 9A-9I muestran imágenes de MSC humanas a una densidad de siembra inicial de 2000 células/cm<sup>2</sup> en sustratos de 250 Pa (Figuras 9A, 9D y 9H), 7500 Pa (Figura 9B, 9E y 9I) y vidrio (Figura 9C, 9F y 9J). Como se muestra en las Figuras 9A-9C, las células se sembraron en placas en sustratos recubiertos con colágeno de tipo I y fibronectina y se capturaron imágenes en modo de contraste de fases después de 24 horas de incubación en medio de cultivo (GM). Las flechas indican la localización de las células. Las Figuras 9D-1F muestran imágenes en las mismas localizaciones después de 7 días de incubación en GM. Las células se mantuvieron a 37 °C durante la captura de imágenes. Se muestran imágenes representativas de 2 experimentos independientes. Como se muestra en las Figuras 9H-9J, la F-actina en MSC humana se marcó con faloidina conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) dos días después de la siembra. También se presenta el área proyectada media ± desviación típica. Se contaron al menos 40 células en siete campos elegidos aleatoriamente para cada condición. Las barras de escala en las Figuras 9A-9F son 900 μm, y las barras de escala en las Figuras 9G-9I son de 20 μm.

Después de dos días en geles de 250 Pa recubiertos con una mezcla de fibronectina y colágeno I, las MSC humanas tenían morfologías relativamente pequeñas, redondeadas con un citoesqueleto de F-actina desorganizado, como se muestra en las Figuras 9A y 9G. Las MSC humanas tuvieron un área celular proyectada promedio de solamente 650 ± 250 μm<sup>2</sup>, que es significativamente menor que un área de proliferación de 3500 ± 1100 μm<sup>2</sup> como se mide en vidrio recubierto con las mismas proteínas de adhesión. Se ha observado un fenotipo similar en fibroblastos, células endoteliales y astrocitos en geles de 250 Pa. (Yeung T, Georges PC, Flanagan LA, *et al.*, "Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion," *Cell Motil Cytoskeleton*. 2005;60:24-34; Pelham RJ, Jr., Wang Y, "Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility," *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:13661-13665; Georges PC, Miller WJ, Meaney DF, *et al.*, "Matrices with compliance comparable to that of brain tissue select neuronal over glial growth in mixed cortical cultures," *Biophysical Journal*. 2006; 90: 3012-3018). Cuando el tiempo de cultivo se extendió a siete días, algunas de las células reforzaron su adhesión a la matriz conforme y comenzaron a proliferar. Sin embargo, como se muestra en la Figura 1D, el número de células no aumentó de forma apreciable. En consecuencia, los geles blandos indujeron una forma redonda, F-actina desorganizada y detención del ciclo celular en MSC humanas derivadas de médula ósea.

En comparación, las MSC humanas mantenidas en geles de 7500 Pa durante dos días proliferaron parcialmente con un área celular proyectada de 2600 ± 1500 μm<sup>2</sup>. Como se muestra en las Figuras 9B y 9E, las MSC humanas mostraron algo de organización de actina pero menos fibras de tensión. Después de siete días, las MSC humanas aparentemente aumentaron su número. Como se muestra en la Figura 9H, también proliferaron crecientemente tras el contacto entre células. Como se muestra en las Figuras 9C, 9F y 9I, las MSC humanas en vidrio mostraron una morfología de proliferación, tuvieron fibras de tensión abundantes y proliferaron rápidamente.

Para investigar si la elasticidad de la matriz puede cambiar el comportamiento proliferativo de MSC humanas, se realizó un ensayo de incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina 5'-trifosfato (BrdU) en células cultivadas en diversos sustratos, como se muestra en la Figura 10. La Figura 10 muestra el porcentaje de células que tuvieron resultados positivos para captación de BrdU, lo que indica células que proliferaron durante el periodo de incubación con BrdU, en sustratos de diversa conformidad. Las células se sembraron en placas en sustratos durante 48 horas antes de incubar las células en medio que contenía BrdU durante una noche. Las células se mantuvieron en medio que contenía suero durante todo el periodo, excepto para las confluyentes en vidrio, que se privaron de suero durante 24 horas antes de añadirse el BrdU en medio sin suero. Los núcleos de las células se tiñeron con anti BrdU y los núcleos se contratiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Se comprobaron al menos 50 células positivas para DAPI con respecto a tinción con BrdU en cada sustrato, y los datos se expresan como media ± ET (error típico) de tres experimentos independientes, con \*p<0,01, lo que confirma la significación estadística.

Después de una incubación durante una noche con BrdU, prácticamente ninguna MSC humana adherida a geles de 250 Pa incorporó BrdU. Por lo tanto, la replicación de ADN se suprimió a pesar de la presencia de suero (la replicación de ADN es una etapa necesaria en la división celular de MSC humanas). En geles de 7500 Pa, aproximadamente la mitad de las células replicó su ADN en 24 horas. Cuando se sembraron de forma dispersa en vidrio, más del 80 % de las células mostraron tinción con BrdU nuclear. Estos resultados implican que la conformidad del sustrato puede afectar significativamente a la progresión del ciclo celular en MSC humanas.

La viabilidad dañada de MSC humanas en un sustrato blando podría explicar las observaciones de que las células en geles de 250 Pa se redondean y dejan de proliferar a pesar de la presencia de suero. Sin embargo, las MSC humanas en geles de 250 Pa no incorporaron azul de tripano, lo que indica que estas células no estaban muertas. Para determinar si la detención del ciclo celular inducida por gel blando es reversible, las células se pusieron en un

ambiente casi tridimensional, como se muestra en las Figuras 11A-11D. Las Figuras 11A-11D ilustran el efecto de un ambiente casi tridimensional en la forma y proliferación de células madre. Las células se sembraron en geles de 250 Pa y se capturaron imágenes después de dos días en medio que contenía suero (Figuras 11A y 11B). El día 2 se usó un sustrato superior de otro gel de 250 Pa (Figura 11C) o un cubreobjetos de vidrio (Figura 11D) para intercalar las células en un ambiente casi tridimensional. Dos días después se tomaron de nuevo imágenes de las células en las mismas localizaciones. En las Figuras 11A-11D, la barra de escala es de 100  $\mu\text{m}$ .

Se colocó un gel de 250 Pa o un cubreobjetos de vidrio, cada uno recubierto con el mismo ligando de matriz que los geles inferiores, sobre MSC humanas no proliferativas redondas en geles de 250 Pa. Las células intercaladas entre los dos geles de 250 Pa permanecieron redondas o proliferaron en un pequeño grado. Como se muestra en la Figura 11C, no se observó ningún aumento evidente en el número de estas células. Por otro lado, como se muestra en la Figura 11D, las células frente a cubreobjetos de vidrio en la parte superior proliferaron y se hicieron de forma de huso. Una vez que las MSC humanas se adhirieron firmemente a la superficie de vidrio superior, se desprendieron del sustrato blando. En consecuencia, las MSC humanas en geles de 250 Pa eran competentes para reanudar la proliferación tras recibir una señal mecánica de un sustrato más rígido.

La detención del crecimiento temporal de MSC humanas en geles de 250 Pa plantea la cuestión de si estas células son competentes para diferenciarse. Se consigue diferenciación mediante un conjunto de acontecimientos altamente coordinado, incluyendo detención del crecimiento y expresión de fenotipos restringidos a linaje celular. Se ha indicado que la elasticidad del sustrato especifica el linaje en el que se diferencian las MSC humanas. (Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE, "Matrix elasticity directs stem cell lineage specification", Cell. 25 Ago 2006; 126(4): 677-89). Se ensayó la diferenciación de adipocitos de MSC humanas en geles que tenían una elasticidad de 250 Pa, que es comparable con la elasticidad de tejidos grasos.

Cuando las células en matrices con diversas rigideces se trataron con un medio de diferenciación adipogénico, hubo una relación inversa entre el porcentaje de células que incorporaban BrdU en sus núcleos y el porcentaje de células que se acumulaban gotas de lípidos detectadas por tinción con ORO.

Las Figuras 12A y 12B muestran la respuesta de MSC humanas a medio de inducción adipogénica. La Figura 12A muestra tinción con Oil Red O (ORO) para acumulación de lípidos en MSC humanas. Las células se sembraron en sustratos de 250 Pa, 7500 Pa o de vidrio y se sometieron a 8 días de medio de cultivo (-), o dos ciclos de inducción adipogénica (+). La Figura 12B muestra la respuesta a dosis de MSC humana a factores de diferenciación químicos en geles de 250 Pa (\*) o vidrio (■). Las células se sembraron a densidades de 2000 células/cm<sup>2</sup> en geles y 20000 células/cm<sup>2</sup> en vidrio. Se contaron al menos 50 células en cada sustrato. Los datos de las Figuras 12A y 12B se expresan como media  $\pm$  ET de tres experimentos independientes y son estadísticamente significativos (\*p<0,02). Los experimentos A y B se llevaron a cabo con diferentes lotes de MSC humanas.

Como se muestra en la Figura 12A, aproximadamente el 75 % de las células sembradas de forma dispersa en geles de 250 Pa acumularon gotas lipídicas, mientras que solamente aproximadamente el 20 % de las células sembradas de forma dispersa en geles de 7500 Pa y el 2 % de las células sembradas de forma dispersa en cubreobjetos de vidrio respondieron a medio de diferenciación adipogénica acumulando gotas lipídicas. Notablemente, las MSC humanas en geles de 250 Pa no acumularon gotas lipídicas sin incubación en un medio de diferenciación adipogénica. Estos resultados indican que una matriz blanda facilita la diferenciación adipogénica de MSC humanas.

La diferenciación adipogénica de MSC humanas se consigue típicamente induciendo un cultivo monocapa confluyente en vidrio. Sin embargo, después de 8 días en medio de inducción, se observó un mayor porcentaje de diferenciación en células dispersas inducidas en geles blandos que en células confluyentes en vidrio. Para determinar adicionalmente cómo las señales mecánicas de un gel blando potencian la adipogénesis inducida químicamente, la sensibilidad de MSC humanas en geles de 250 Pa a un medio de diferenciación adipogénico se ensayó induciendo la detención del crecimiento en dos ambientes: (1) sembrar de forma dispersa en geles de 250 Pa y (2) sembradas de forma densa en cubreobjetos de vidrio. La tasa de diferenciación adipogénica se comparó entre estas dos condiciones en respuesta a concentraciones decrecientes de factores de inducción químicos. Como se muestra en la Figura 12B, a medida que se redujo la concentración de los factores adipogénicos, las MSC humanas en geles de 250 Pa mostraron una respuesta similar a la de MSC humanas en cubreobjetos de vidrio. Aunque el cultivo en geles de 250 Pa produjo MSC humanas sembradas de forma dispersa competentes para la diferenciación adipogénica, este ambiente no afectó a la sensibilidad de MSC humanas a su medio de diferenciación adipogénica.

La diferenciación adipogénica eficaz de MSC humanas con crecimiento detenido en geles de 250 Pa plantea la posibilidad de que estas células no proliferativas puedan haberse diferenciado en preadipocitos y haberse comprometido a un linaje adipogénico en lugar de permanecer células madre inactivas. Para determinar si estas células son células madre inactivas o preadipocitos diferenciados, se sembraron de forma dispersa MSC humanas en un gel blando durante dos días, se transfirieron a un cubreobjetos de vidrio usando el método casi tridimensional analizado anteriormente, y finalmente se cultivaron en medio de inducción de osteoblastos durante 24 días (como se ha analizado anteriormente, las células en geles de 250 Pa que se transfirieron a un sustrato rígido tras el contacto reanudaron la proliferación y adquirieron un fenotipo en huso típico de MSC humanas en plástico de cultivo tisular).

5 Las Figuras 13A y 13B ilustran la deposición de calcio visualizada con Alizarin Red S después de estimulación con medios de osteoinducción. Como se muestra en la Figura 13A, las células se cultivaron en un gel blando durante dos días y después se transfirieron a un cubreobjetos de vidrio usando el método casi tridimensional y después se incubaron con medio de osteoinducción durante 24 días. Como se muestra en la Figura 13B, las MSC humanas se cultivaron en un cubreobjetos de vidrio durante 24 días en medio de osteoinducción. En las Figuras 13A y 13B, la barra de escala es de 200  $\mu\text{m}$ .

10 Después de 24 días en medio de inducción de osteoblastos, la matriz extracelular rica en calcio era claramente visible en la placa de cultivo y tenía tinción positiva con Alizarin Red S, como se muestra en la Figura 13A. La mineralización de matriz es un marcador de estadio tardío de diferenciación de osteoblastos. (Kundu AK, Putnam AJ, "Vitronectin and collagen I differentially regulate osteogenesis in mesenchymal stem cells", *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 347: 347-357).

15 Para comparación, se sembraron células que no se habían cultivado nunca en un gel blando en un cubreobjetos de vidrio y se trataron con medio de inducción de osteoblastos durante el mismo periodo de tiempo. Como se esperaba, estos sustratos también tuvieron tinción positiva para deposición de calcio, como se muestra en la Figura 13B. Sin estimulación por medio de inducción de osteoblastos, ninguna de las condiciones produjeron matriz extracelular que se tiñera con Alizarin Red S. Estos resultados demuestran que las MSC humanas en geles de 250 Pa mantienen su potencial multilinaje. En consecuencia, estos resultados verifican que las MSC humanas sembradas en geles  
20 blandos no se diferencian sino que permanecen inactivas como células madre.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para inducir o mantener una inactividad en una célula madre mesenquimal y sostener la capacidad de la célula para reanudar la proliferación e iniciar la diferenciación *ex vivo*, que comprende: poner en contacto la célula madre mesenquimal con un gel o una matriz de gel recubierto con una proteína de adhesión que se une con integrina en la membrana de la célula madre mesenquimal, teniendo dicho gel o dicha matriz de gel un módulo de cizalla en un intervalo de 150-750 Pa; y proporcionar a la célula madre mesenquimal material nutriente.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho gel o dicha matriz de gel es bidimensional o tridimensional.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la célula madre mesenquimal se selecciona del grupo que consiste en una célula madre mesenquimal derivada de médula ósea (MSC), una célula madre renal, una MSC derivada de músculo esquelético, MSC derivada de hueso, una MSC de pulpa dental, una MSC derivada de músculo cardíaco, una MSC derivada de líquido sinovial, una MSC del cordón umbilical y una MSC derivada de tejido adiposo.
4. El método de la reivindicación 1, en el que, antes del contacto, la célula madre mesenquimal no está en un estado inactivo.
5. Un método para inducir proliferación *ex vivo* en una célula madre mesenquimal, que comprende las etapas de llevar a cabo el método de la reivindicación 1, poner en contacto la célula madre mesenquimal *ex vivo* con un material inductor de proliferación que comprende un gel o una matriz de gel recubierto con una proteína de adhesión que se une con integrina en la superficie de la célula madre mesenquimal, teniendo dicho gel o dicha matriz de gel un módulo de cizalla de 7500 Pa; y proporcionar material de crecimiento de nutrientes para promover la proliferación de la célula madre mesenquimal y su descendencia *ex vivo*.
6. Un método para inducir diferenciación *ex vivo* en una célula madre mesenquimal, que comprende las etapas de: llevar a cabo el método de la reivindicación 1 o llevar a cabo el método de la reivindicación 5; poner en contacto la célula madre mesenquimal con un material de diferenciación que comprende estímulos mecánicos y/o químicos seleccionados para estimular la diferenciación de la célula madre mesenquimal en un tipo celular predeterminado; y proporcionar a la célula diferenciada material nutriente de células diferenciadas.
7. El método de la reivindicación 6, en el que la célula madre mesenquimal es una célula madre mesenquimal derivada de médula ósea humana, y en el que la célula diferenciada es un osteoblasto, un condrocito, un miocito, un adipocito, una célula de islotes beta pancreáticos, una célula neuronal o una célula de tejido conectivo.
8. El método de la reivindicación 1 o 5, en el que:
  - (a) dicho gel o dicha matriz de gel comprende acrilamida y bisacrilamida; y/o
  - (b) dicha proteína de adhesión es un colágeno, una fibronectina o una combinación de los mismos.
9. Un método para conservar una población de células madre mesenquimales, comprendiendo dicho método la etapa de cultivar dicha población de células madre mesenquimales en un gel o una matriz de gel que tiene un módulo de cizalla en un intervalo de 150 Pa a 750 Pa.
10. El método de la reivindicación 9, en el que dicho gel o el gel en dicha matriz de gel comprende un agente gelificante y una mezcla de acrilamida-bisacrilamida y en el que dicho gel o dicha matriz de gel se recubre con una proteína de adhesión.
11. El método de la reivindicación 10, en el que dicha proteína de adhesión es un colágeno, una fibronectina o una combinación de los mismos.
12. El método de la reivindicación 9, por el que
  - (a) la longitud del telómero de dicha población de células madre mesenquimales se mantuvo; y/o
  - (b) dicha población de células madre mesenquimales se mantiene en un estado inactivo; y/o
  - (c) dicha población de células madre mesenquimales conserva una capacidad para diferenciarse en un tipo celular seleccionado de un adipocito o un osteoblasto; y/o
  - (d) dicho gel o dicha matriz de gel comprende además un suero animal; y/o
  - (e) la etapa de cultivar dicha población de células madre mesenquimales en un gel o una matriz de gel se precede de una etapa de cultivo de dicha población de células madre mesenquimales en un aparato de cultivo tisular; y/o
  - (f) la etapa de cultivar se realiza directamente después del aislamiento, la purificación o el enriquecimiento de dicha población de células madre mesenquimales de una muestra biológica.
13. El método de la reivindicación 9, que comprende además la etapa de sembrar posteriormente dicha población de células madre mesenquimales en un aparato de cultivo tisular.

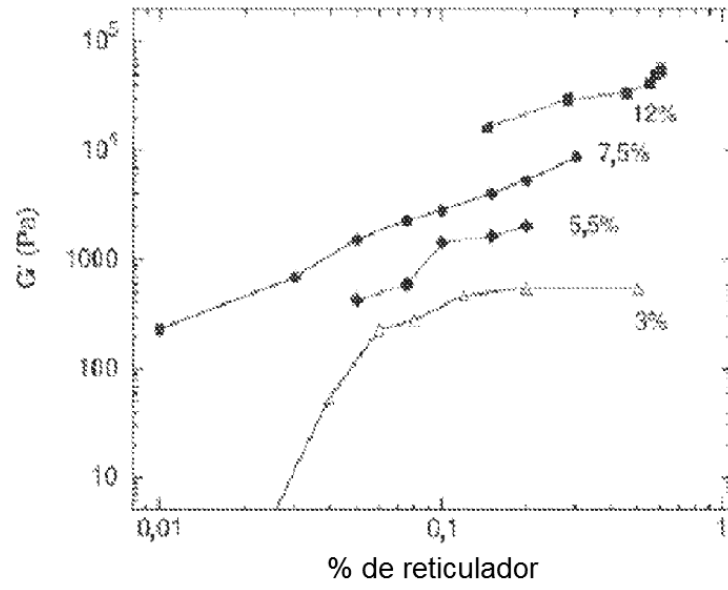


FIGURA 1A

gel rígido

gel blando

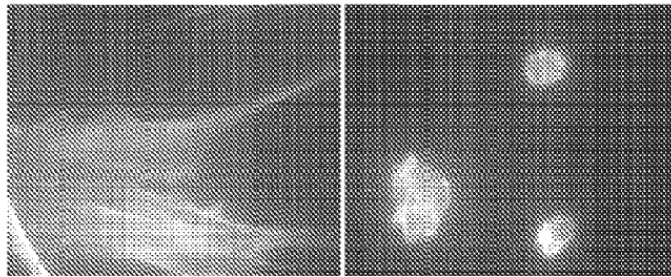


FIGURA 1B

VIDRIO

GEL BLANDO

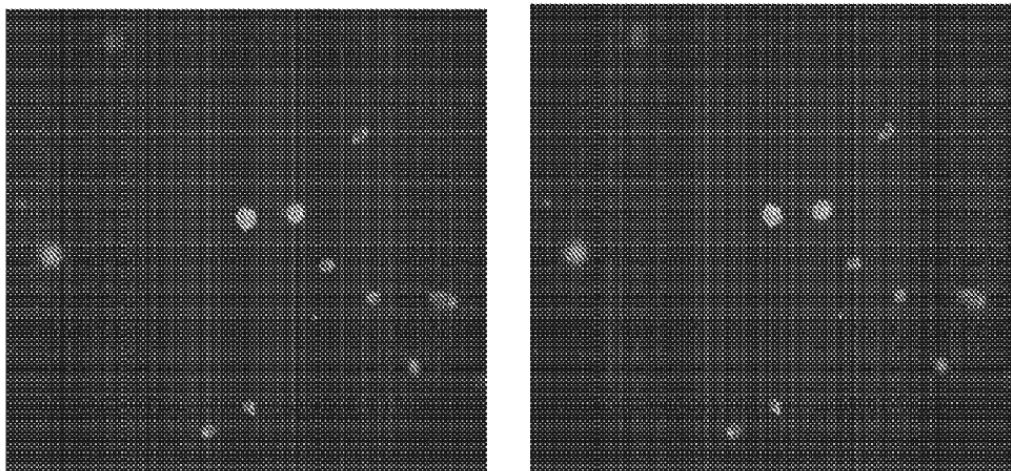


FIGURA 1C

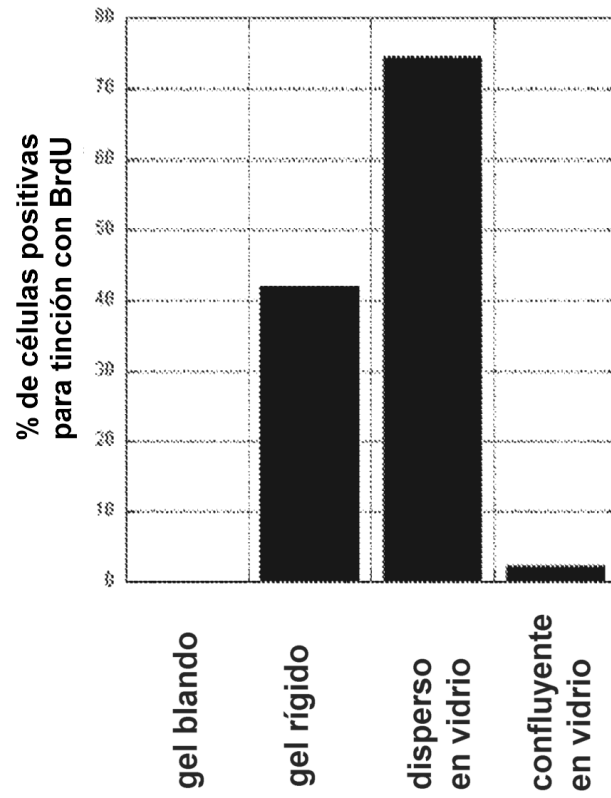


FIGURA 2



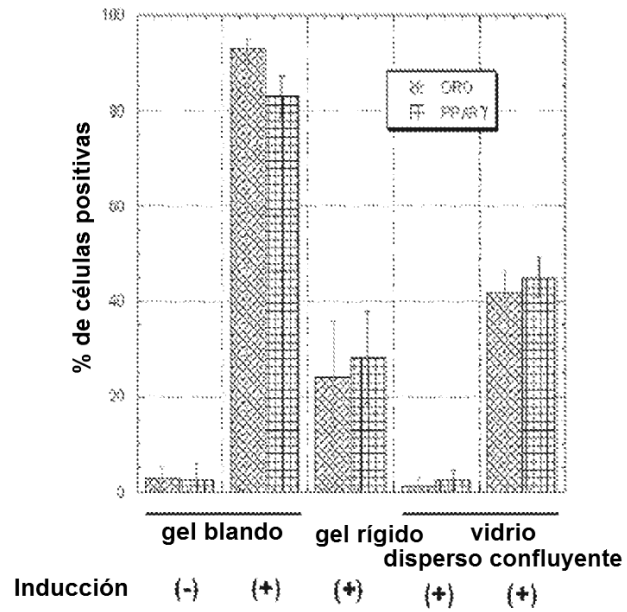


FIGURA 3A

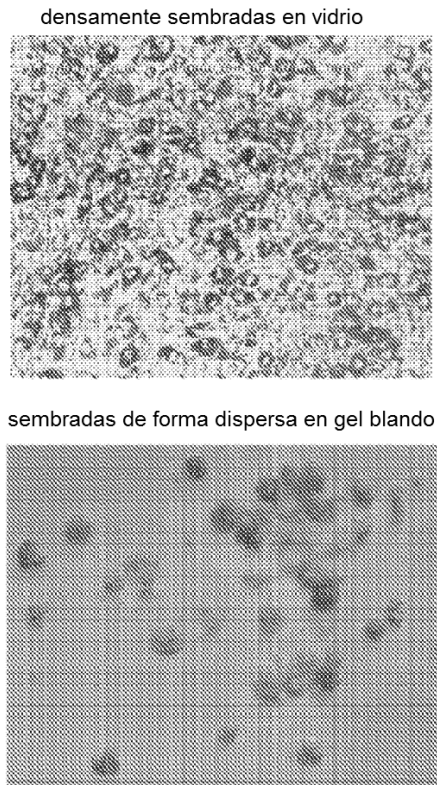


FIGURA 3B

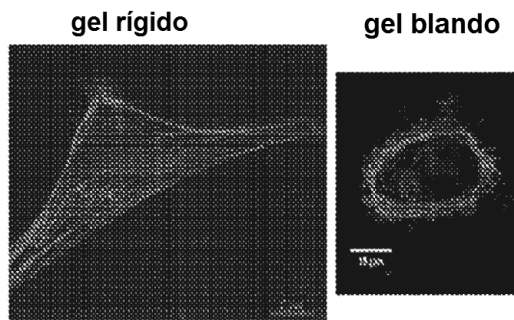


FIGURA 4

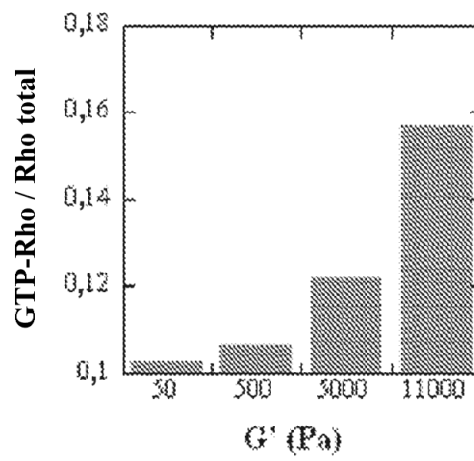


FIGURA 5

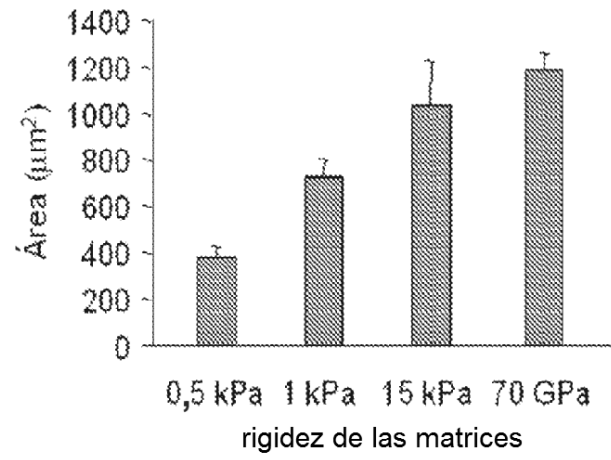


FIGURA 6

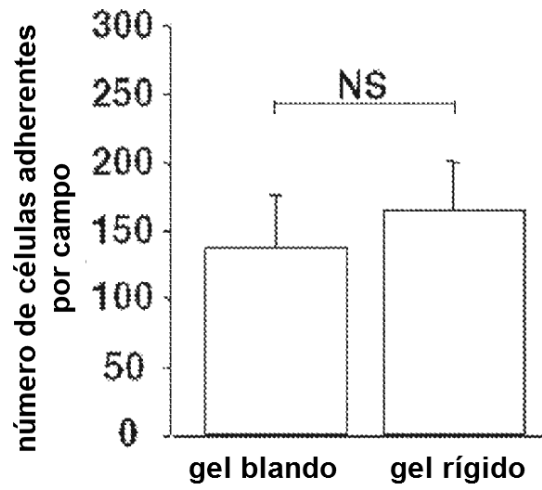
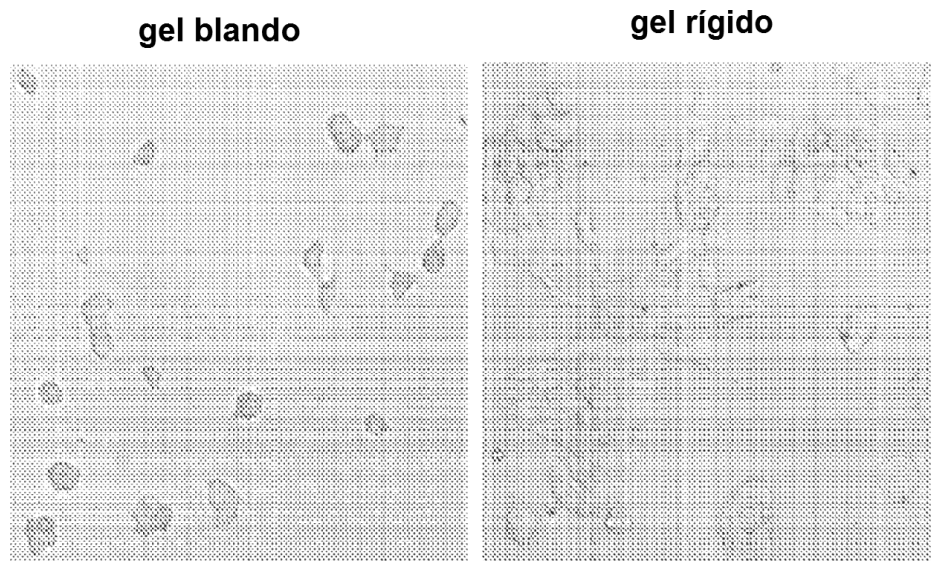


FIGURA 7



**FIGURA 8**

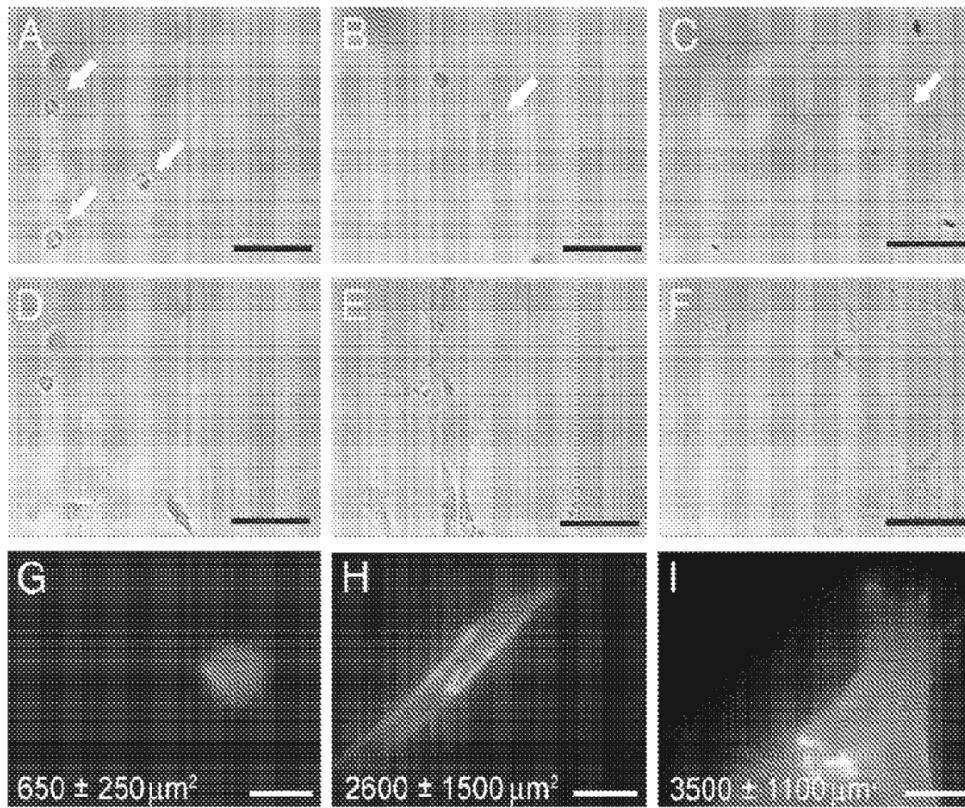


FIGURA 9A-9I

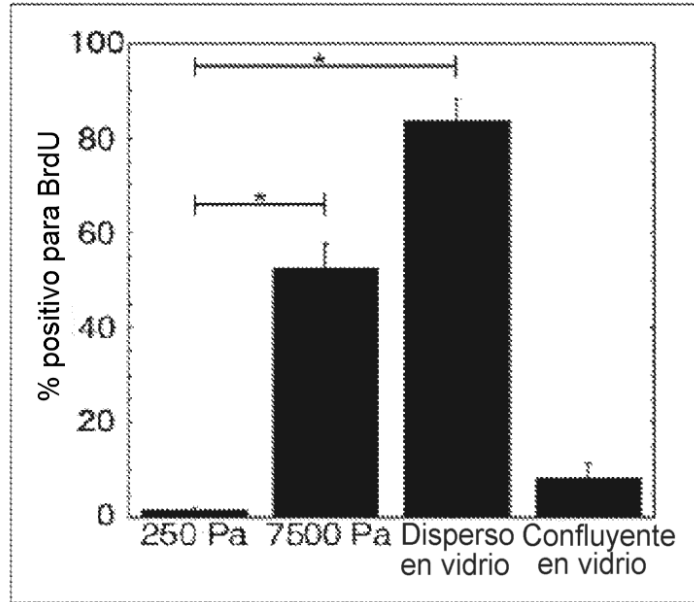


FIGURA 10

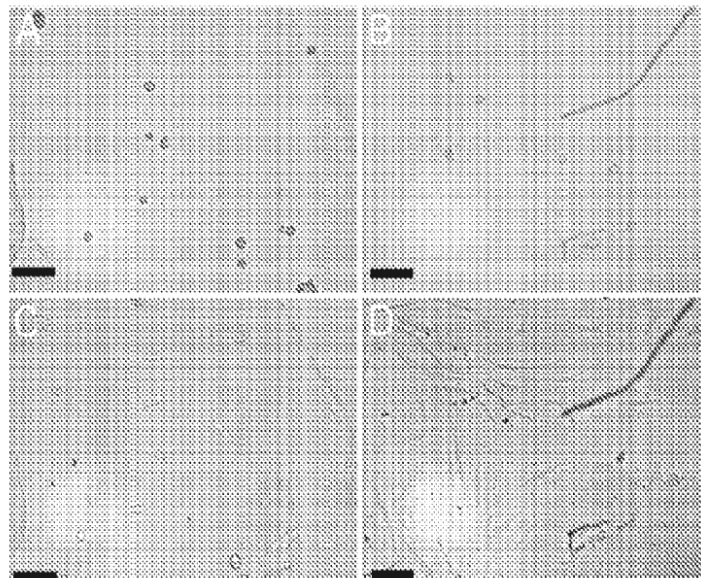


FIGURA 11A-11D

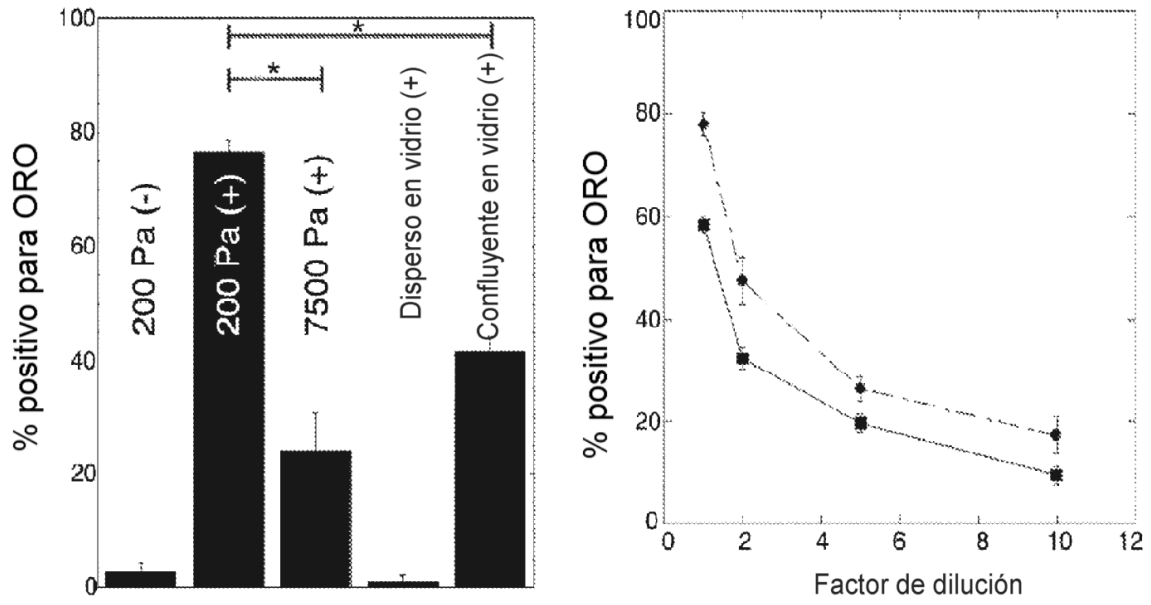
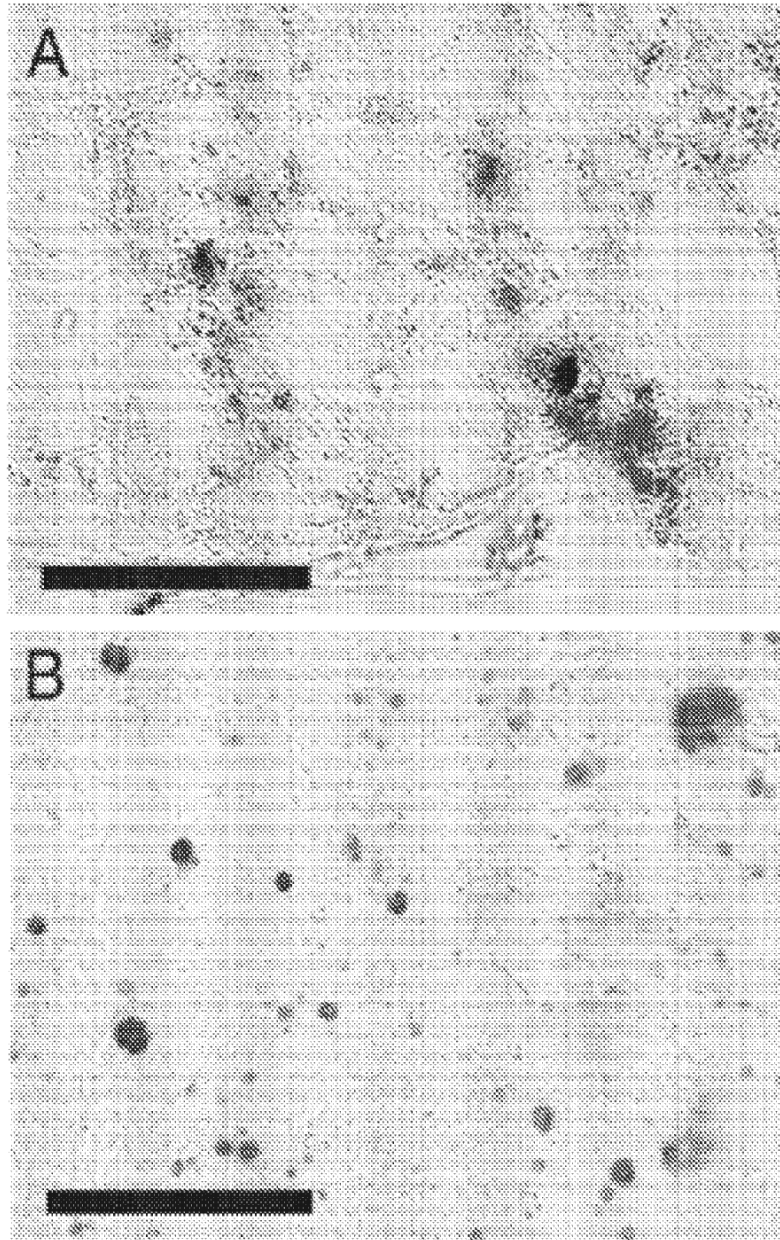


FIGURA 12



**FIGURA 13A-B**



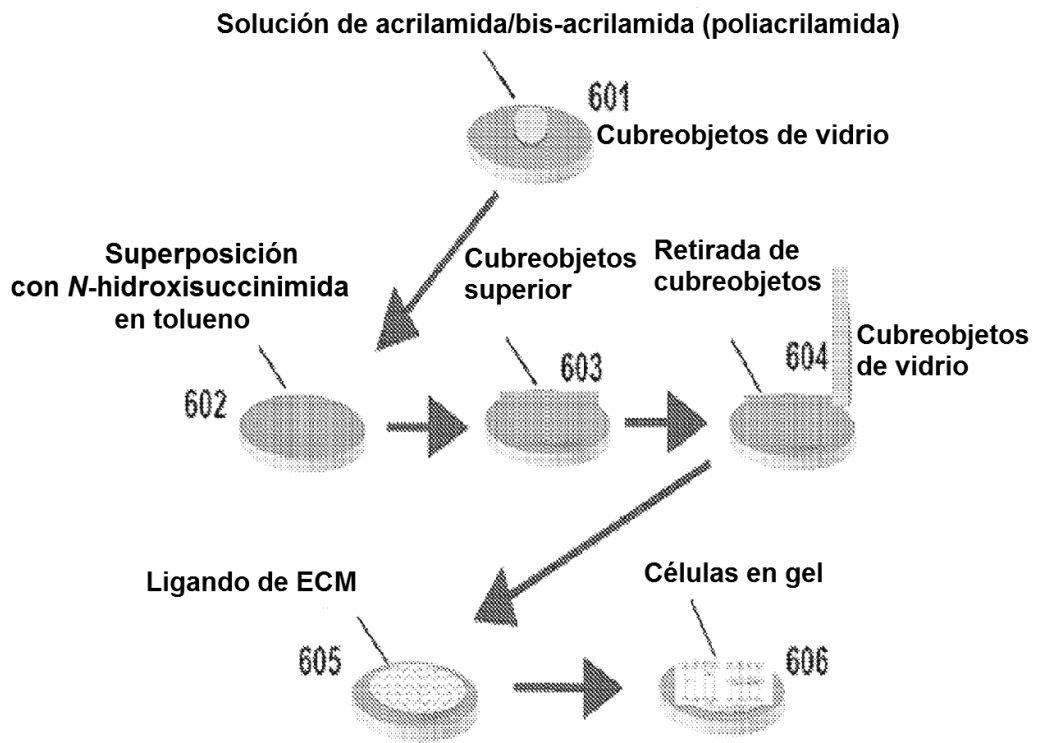
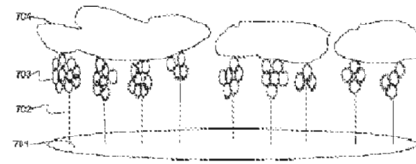
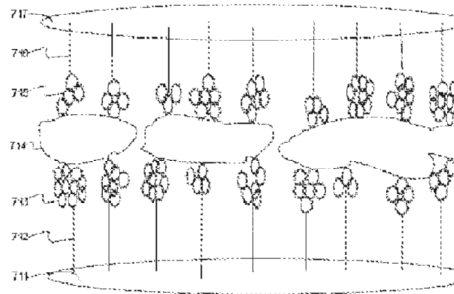


Figura 14



B



B

FIGURA 15