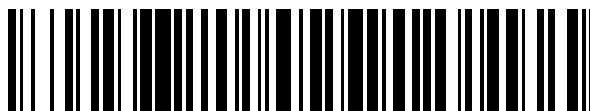


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 580 161**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

C12N 5/077 (2010.01)

C12N 5/079 (2010.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

C12N 5/0789 (2010.01)

C12N 5/09 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2008 E 08826041 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2016 EP 2173859**

54 Título: **Sistemas de geles blandos en la modulación del desarrollo de células madre**

30 Prioridad:

29.06.2007 US 929488 P

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

19.08.2016

73 Titular/es:

**FUNAKI, MAKOTO (100.0%)
330 SUMMIT ROAD
MEDIA, PA 19063, US**

72 Inventor/es:

**FUNAKI, MAKOTO;
JANMEY, PAUL, A. y
WINER, JESSAMINE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 580 161 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

Sistemas de geles blandos en la modulación del desarrollo de células madre

5 Campo de la invención

La presente invención proporciona métodos de modulación del desarrollo de células madre usando geles blandos. Específicamente, la invención proporciona métodos para la modulación del 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. En este momento, las aplicaciones de células madre mesenquimales adultas aún están limitadas a un estado preclínico, 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 mediante transducción de la 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, en entornos *in vitro* se observó transformación de células madre mesenquimales transducidas con telomerasa.

15

20

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

25

Engler *et al* Cell Vol. 126, n.º 4, páginas 677-689 (2006) muestran que la elasticidad de la matriz conduce a la especificación del linaje de células madre. Las células madre mesenquimales (CMM) vírgenes mostraron que especificaban linaje y estaban dedicadas a fenotipos con extrema sensibilidad hacia elasticidad a nivel tisular.

30

Zhou *et al*, Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology 23(4), páginas 369-371 (2007) se refieren al efecto del cultivo bajo en suero en la sincronía del ciclo celular de células madre mesenquimales. Las CMC se cultivaron e identificaron con CD44, CD90, CD71 y CB11b por citometría de flujo. El ciclo celular y la apoptosis se detectaron en cultivo normal y bajo en suero por citometría de flujo. Se descubrió que el cultivo prolongado en medio con privación de suero indujo la detención del ciclo celular en el estadio G0/G1.

35

Sumario de la invención

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

40

La presente invención proporciona un método de inducción de la diferenciación de una población de células madre mesenquimales quiescentes en una población de un tipo de célula de interés, comprendiendo dicho método las etapas de (a) mantener dicha población de células madre mesenquimales en quiescencia, conservando la capacidad de que dicha población de células madre mesenquimales se diferencie en múltiples tipos de células y conservando la capacidad proliferativa de dicha población de células madre mesenquimales en presencia de un aparato que

45

contiene un gel o una matriz de gel que tiene un módulo de cizalla en un intervalo de 150-750 Pa; y (b) cultivar dicha población de células madre mesenquimales en presencia de un medio de inducción, induciendo de este modo la diferenciación de dicha población de células madre mesenquimales en una población de un tipo de célula de interés.

50

En una realización, la población de un tipo de célula de interés es una población de adipocitos.

En una realización, la población de un tipo de célula de interés es una población de osteoblastos.

En algunas realizaciones:

55

(a) el gel o la matriz de gel comprende adicionalmente un suero animal; y/o

(b) la etapa de mantenimiento de la población de células madre mesenquimales en un gel o una matriz de gel está precedida por una etapa de cultivo de la población de células madre mesenquimales en un aparato de cultivo tisular; y/o

60

(c) la etapa de mantenimiento se realiza directamente después del aislamiento, purificación o enriquecimiento de la población de células madre mesenquimales a partir de una muestra biológica.

65

En una realización, el medio de inducción es un medio de inducción adipogénico.

En algunas realizaciones:

- (a) el gel o matriz de gel comprende acrilamida y bisacrilamida; y/o
- 5 (b) el gel o la matriz de gel es bidimensional o tridimensional; y/o
- (c) el gel o la matriz de gel se recubre con una proteína de adhesión; y/o
- (d) la población de células madre mesenquimales es una población de células madre mesenquimales adulta; y/o
- 10 (e) La población de células madre mesenquimales es una población de células madre mesenquimales humanas.

En algunas realizaciones:

- 15 (a) el gel o el gel en la matriz tiene una concentración total de acrilamida de 3 % y una concentración total de bisacrilamida de 0,06 % a 0,5 %, una concentración total de acrilamida de 5,5 % y una concentración total de bisacrilamida de 0,05 % a 0,075 % o una concentración total de acrilamida de 7,5 % y una concentración total de bisacrilamida de 0,01 % a 0,03 %; y/o
- 20 (b) la proteína de adhesión es un colágeno, una fibronectina, o una combinación de los mismos.

Breve descripción de las figuras

25 Figura 1. A. Propiedades mecánicas de sustratos de poliacrilamida. El módulo de cizalla de los geles de poliacrilamida se midió 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 CMMh en matrices rígidas o blandas. C. Forma de la célula y estructura de F-actina de CMMh en geles blandos y vidrio.

Figura 2. Incorporación de BrdU en CMMh.

35 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 γ 2.

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

40 Figura 5. Cuantificación del aumento de la actividad de Rho de geles blandos con respecto a duros. Se sembraron astrocitos en geles de poliacrilamida 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.

45 Figura 7. Las células de melanoma se adhieren a geles blandos y rígidos con la misma eficiencia.

Figura 8. Población más grande de células de melanoma en geles rígidos.

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

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

55 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.

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

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

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

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

Descripcion detallada de la invencion

- 5 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 fabricarlo y métodos para conservar una población de células madre mesenquimales o estudiar células madre mesenquimales que los comprenden.
- 10 En el presente documento también se describe un método de fabricación de un gel de poli(acrilamida) con una rigidez en el intervalo de 150-750 Pa, que comprende las etapas de polimerizar una composición que comprende acrilamida y bis(acrilamida), produciendo de esta manera un gel de poli(acrilamida) blando y recubrir el gel de poli(acrilamida) blando con una composición que comprende un colágeno de tipo I y una fibronectina, fabricando de este modo un gel de poli(acrilamida) que tiene una rigidez en el intervalo de 150-750 Pa. En otra realización, la composición tiene una relación de mezcla de acrilamida: bis(acrilamida) de entre 100:1 y 30:1. En otra realización, el gel tiene una relación de mezcla de acrilamida: bis(acrilamida) de entre 100:1 y 30:1. En otra realización, la composición tiene una concentración total de acrilamida de 3-5 %. En otra realización, el gel o la matriz de gel tiene una concentración total de acrilamida de 3-5 %. En otra realización, la composición es una solución. En otra realización, la composición es una suspensión. En otra realización, la composición es cualquier otro tipo de composición conocida en la técnica. Cada posibilidad representa una realización distinta.
- 15
- 20 En el presente documento también se describe un método de fabricación de 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.
- 25
- 30 En el presente documento también se describe un método para preservar una población de células madre mesenquimales, comprendiendo el método la etapa de cultivar la población de células madre mesenquimales en un gel o matriz de gel con una rigidez en un intervalo de 150-750 Pa, preservando de este modo una población de células madre mesenquimales. En otra realización, la etapa de cultivar se realiza en ausencia de inducción química. En otra realización, la etapa de cultivar se realiza en ausencia de un medio de inducción. Cada posibilidad representa una realización distinta.
- 35
- 40 En el presente documento también se describe un método para preservar una célula madre mesenquimal, comprendiendo el método de la etapa de cultivar la población de células madre mesenquimales en un gel o matriz de gel con una rigidez en un intervalo de 150-750 Pa, preservando de este modo una célula madre mesenquimal. En otra realización, la etapa de cultivar se realiza en ausencia de inducción química. En otra realización, la etapa de cultivar se realiza en ausencia de un medio de inducción. Cada posibilidad representa una realización distinta.
- 45
- 50 En el presente documento también se describe un método para inducir la quiescencia de una célula transformada, que comprende la etapa de cultivar la célula transformada en un gel o matriz de gel de los métodos de la presente invención, induciendo de este modo la quiescencia 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.
- 55
- 60 En otra realización de los 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 cuanto a la longitud. En otra realización, el término se refiere a una falta de cambio medible en cuanto a la longitud. En otra realización, el término se refiere a una falta de suficiente cambio en cuanto a la longitud que afecte a la capacidad proliferativa. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.
- 65
- En otra realización de los métodos de la presente invención, la población de células madre mesenquimales se mantiene en un estado quiescente. "Quiescente" 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, "quiescencia" se refiere a cualquier otra definición del término aceptada en la técnica. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.
- En una realización, cuando la célula madre es una célula mesenquimal humana derivada de médula ósea, la matriz extracelular (MEC) 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 de colágeno y fibronectina puede variar, y en una realización, la relación de colágeno con respecto a fibronectina es de aproximadamente 5:1. También pueden usarse otras relaciones de colágeno y fibronectina. Un experto habitual en la técnica apreciará que el colágeno y la fibronectina pueden obtenerse de otras fuentes, y que

pueden usarse sustancias distintas de colágeno y fibronectina para presentar elasticidad y unirse con integrinas en la superficie de la membrana celular de manera que se induzca la quiescencia de la célula.

De acuerdo con realizaciones de la presente invención, el material extracelular (MEC) está provisto de una elasticidad aparente apropiada acoplado el MEC con un sustrato de tal manera que una célula madre se entra en contacto con el MEC detecta la elasticidad del sustrato. En consecuencia, el sustrato puede ser un material cuya elasticidad, cuando se acopla al MEC, detecta una célula madre que entra en contacto con el MEC. En algunas realizaciones, el sustrato es vidrio. En otras realizaciones, el sustrato es un gel con una elasticidad de 250 Pa, o un gel con una elasticidad de 7.500. Estos geles pueden ser geles de poliacrilamida, y, como conocen los expertos en la materia, la elasticidad de los geles de poliacrilamida puede modificarse, por ejemplo, cambiando las concentraciones de acrilamida y bisacrilamida en la formulación de gel. La fabricación de geles de diversa elasticidad que pueden usarse en el método de la presente invención será obvia 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. En la presente memoria descriptiva se describen procedimientos ejemplares para preparar y medir la elasticidad de tejido de rata y de tejido bovino. La siguiente tabla 1 proporciona la elasticidad de diversos tipos de tejidos:

Tabla 1

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

En una realización, las CMM humanas en geles de 250 Pa están en un estado quiescente esperando una señal adicional para determinar su destino. En una realización, las CMMh 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 inducción tanto 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 la diferenciación de osteoblastos. El requisito de estimulación mecánica y química sincronizada explica, en una realización, cómo las CMM humanas pueden compartimentalizarse en tejidos compatibles, tales como médula ósea, y aun así resistir a la diferenciación espontánea.

Como la elasticidad de la matriz, en otra realización, la elección de ligando extracelular afecta en gran medida a la adhesión y diferenciación de CMM humanas. Se encuentra colágeno de tipo I 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 garantiza 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 las células a los geles de 250 Pa sin afectar al potencial de diferenciación.

Las CMM 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 obtener una adhesión inicial fuerte.

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

En una realización, cuando las CMM humanas no proliferativas se presentan con un sustrato de vidrio recubierto con matriz de gel proteico, las células desarrollan una morfología fusiforme 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 muestre un fenotipo neuronal con protuberancias de tipo neurita en geles blandos de 250 Pa sin ninguna inducción química.

5 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 organismo tienen elasticidades similares. Por ejemplo, todos los tejidos cerebral, graso y de
médula ósea, tienen un módulo de almacenamiento de aproximadamente 200 Pa, aunque todos mantienen
10 poblaciones únicas de células. En una realización, se almacenan CMM humanas *in vivo* en la médula ósea de un
individuo durante décadas y aún conservan multipotencialidad. En una realización, se cultivan CMM humanas *ex vivo*
en plástico de cultivo tisular rígido y conservan multipotencialidad durante varios meses. 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 las mecánicas del sustrato, en otras realizaciones,
un ambiente mecánico inapropiado evita una respuesta celular normal a agonistas químicos. En una realización, las
15 células quiescentes se diferencian en osteoblastos solamente como resultado del cambio de su ambiente tanto físico
como químico a los que estimulan la osteogénesis. Por consiguiente y en una realización, una matriz con elasticidad
apropiada tiene la capacidad de mantener una población quiescente de células madre mesenquimales de médula
ósea multipotenciales que responden a estímulos tanto mecánicos como químicos que conducen la proliferación y
diferenciación.

20 La Figura 14 ilustra un diagrama de flujo para preparar una realización de un sistema para inducir quiescencia,
diferenciación y proliferación en células madre adultas de acuerdo con diversas realizaciones de la presente
invención. Se prepara soluciones de acrilamida y bisacrilamida en solución salina tamponada con fosfato (PBS)
hasta un volumen total de 500 μ 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'-
25 tetrametilendiamina) 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 μ 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 μ 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
30 superior, un cubreobjetos clorosilanizado se coloca 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 MEC, 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 I y 0,02 mg/ml de fibronectina. En una etapa adicional
35 (no representada), los geles se lavan tres 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 vuelven quiescentes incluso en presencia de estímulos químicos que
provocan proliferación o diferenciación.

40 Por consiguiente, en el presente documento se describe un método para inducir o mantener la quiescencia y
sostener la actividad biológica en una célula madre somática *ex vivo* que comprende: poner en contacto la célula
madre somática con una matriz de gel que comprende un material extracelular que se une con integrina en la
membrana de la célula madre somática; teniendo dicha matriz de gel una elasticidad sustancialmente similar a la
45 elasticidad del microambiente biológico predominante *in vivo* de la célula madre somática del mismo tipo *in vivo*; y
proporcionar a la célula madre somática material nutriente para sostener la actividad biológica de la célula madre
somática *ex vivo*.

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

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

65 En realizaciones de los métodos de la presente invención, una célula madre que no está en un estado quiescente se
pone en contacto con MEC de acuerdo con métodos de la presente invención de tal manera que se induce la
quiescencia en la célula y pasa de un estado no quiescente a un estado quiescente. En otras realizaciones, una
célula madre quiescente se pone en contacto con MEC de acuerdo con métodos de la presente invención de tal
manera que la quiescencia se mantenga en la célula y no pase a un estado quiescente.

Por consiguiente, en el presente documento se describe 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 I, 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 de crecimiento modulador, por lo que la exposición al producto químico o factor físico da como resultado un aumento de la rigidez de la matriz de gel que coincide con la rigidez del MEC en el microambiente en el cual se pretende diferenciar la célula madre mesenquimal.

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 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 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 realización distinta de la presente invención.

En otra realización, la replicación se reduce en 50 % en relación con la 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 98 % en relación con una placa de cultivo tisular. En otra realización, la replicación se reduce en 99 % en relación con una placa de cultivo tisular. Cada posibilidad representa realización distinta de la presente invención.

En otra realización, un método de la presente invención comprende adicionalmente la etapa de sembrar posteriormente (por ejemplo, después de cultivar en presencia de un gel o una matriz de gel de los 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.

En el presente documento también se describe 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 por lo tanto la proliferación o diferenciación de una célula madre mesenquimal.

La población de adipocitos de los 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 realiza después de cultivo. En otra realización, el aislamiento de la fuente biológica se realiza después de cultivo y de una etapa de purificación o enriquecimiento. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

5 En otra realización, la población celular de los métodos de la presente invención se cultiva en presencia de un gel o una matriz de gel de los métodos de la presente invención. En otra realización, la población celular se cultiva en el gel o matriz de gel. En otra realización, la población celular se cultiva en el gel o 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.

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

15 En otra realización, las células “mesenquimales” de los métodos de la presente invención se aíslan o purifican 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.

20 Un gel o una matriz de gel de los métodos de la presente invención tienen un módulo de cizalla de 150-750 Pa.

25 En otra realización, un gel o una matriz de gel de los métodos y composiciones de la presente invención tienen una rigidez equivalente a la de 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.

30 En una realización, la matriz de gel descrita en el presente documento es capaz de formar geles de diversas fuerzas, dependiendo de su estructura y concentración así como, en otra realización, de factores ambientales tales como fuerza iónica, pH y temperatura. La viscosidad y el comportamiento del gel combinados denominado “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 (η^*) son los parámetros que se busca cambiar usando los métodos descritos en el presente documento, y estos se analizan en otra realización modificando la tensión o presión de forma armónica con el tiempo (Tabla 1). Estos parámetros derivan del módulo complejo (G^*), que es la relación de tensión máxima frente a presión máxima, y el ángulo de fase (δ), que es el ángulo en el que están fuera de fase la tensión y la presión.

Tabla 2. Relación entre módulos dinámicos, ángulo de fase (δ) y frecuencia (ω).

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 de 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	η^*	G^*/ω	Flujo viscoelástico

40 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 una fuerza constante, el desplazamiento elástico permanece constante en una realización, mientras que el desplazamiento deslizante continúa, aumentando de este modo.

45 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 al 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.

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

55
$$G^* = G' + iG''$$

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; $G^* = E (G'^2 + G''^2)$. La frecuencia con la que estos parámetros se cruzan corresponde a un tiempo de relajación (τ) específico del material.

5 En una realización, las propiedades viscoelásticas lineales de las matrices de gel descritas en el presente documento se determinan 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 (ω) creciente. En otra realización, a una concentración de 1,5 a 2 % (p/p) de derivado de celulosa de solución acuosa y a una temperatura de aproximadamente 20 °C, el comportamiento de G' y G'' para los derivados de celulosa es tal que a una frecuencia angular (ω) baja, 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 inversamente relacionadas y la elasticidad (rigidez) de un material puede medirse usando un reómetro de espectrómetro de fluidos RFS III, disponible en Rheometrics, Piscataway, NJ, usando una presión de cizalla oscilante del 2 % a una frecuencia de 10 radianes por segundo. La elasticidad y otras 10 propiedades reológicas de las células y de 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. Al igual que la viscosidad reducida, tiene unidades de concentración recíproca, por ejemplo, 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 los 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 I. 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 LOS métodos de la presente invención es un colágeno recombinante. En otra realización, el colágeno se purifica de una fuente biológica. En otra realización, el colágeno es un colágeno de tipo I. 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 los métodos de la presente invención es una fibronectina recombinante. En otra realización, la fibronectina se purifica de una fuente biológica. En otra realización, la fibronectina es una fibronectina de tipo I. 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 los 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 los 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.

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.

En otra realización, un gel de acrilamida de los 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.

En otra realización, el agente gelificante de los 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.

En otra realización, la concentración de la proteína de fibrina o fibrinógeno recombinante en un gel o una matriz de gel de los 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.

En otra realización, una proteína fibrina o fibrinógeno de los métodos de la presente invención es una proteína fibrina o fibrinógeno de un animal heterotermo. En otra realización, la proteína fibrina o fibrinógeno es una proteína fibrina o fibrinógeno de un animal homeotermo. 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.

En otra realización, el agente gelificante es agarosa. En otra realización, el agente gelificante es agar. En otra realización, el agente gelificante es un glucosaminoglicano. 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 los métodos de la presente invención es cualquier otro agente gelificante conocido en la técnica. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

5 En otra realización, el gel o la matriz de gel de los métodos de la presente invención es 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.

10 En otra realización, un gel o una matriz de gel de los 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.

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

20 En otra realización, un inhibidor de proteasa de los 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.

25 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-antiquimotripsina. 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. En otra realización, el inhibidor es aprotinina. En otra realización, el inhibidor es pentamidina isetonato. 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.

45 En otra realización, la cantidad de inhibidor de proteasa que se utiliza en los 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.

55 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.

En otra realización, la cantidad de inhibidor de proteasa que se utiliza en los 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

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

En otra realización, la proteasa a la que se dirige el inhibidor de proteasa de los métodos de la presente invención es una serina 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 en el intestino delgado. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

La población de células madre mesenquimales de los 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.

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

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.

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.

El método de la presente invención comprende 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 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 epidérmicas. 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.

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.

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

La población de células progenitoras de los 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 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.

"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 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 los 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 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 método de la presente invención se usa como vehículo para agentes antineoplásicos (Kassem M, Ann N Y Acad Sci. Mayo 2006; 1067: 436-42). Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

En la técnica se conocen bien métodos para determinar la capacidad proliferativa y fuerza 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), 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 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.

En el presente documento también se describen métodos para inducir la proliferación de una célula madre somática quiescente. Se ha descubierto que la puesta en contacto de 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 la proliferación de la célula madre. Las realizaciones de la divulgación incluyen por lo tanto 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 quiescentes 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 de tejido 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 la proliferación de una célula madre 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 la 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.

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*. Los expertos en la materia conocen la formulación del material de crecimiento de nutrientes para tipos celulares particulares 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.

Al igual que otros aspectos de la presente invención y de la divulgación, pueden llevarse a la práctica realizaciones de este aspecto inductor de proliferación con células madre, incluyendo CMM. Las CMM pueden recogerse de tejido vivo, como se describe en esta memoria descriptiva, o pueden obtenerse de otras fuentes tales como cultivos *in vitro* y células madre congeladas de forma criogénica. Dichas células pueden estar en un estado quiescente de origen natural o en un estado quiescente inducido artificialmente y pueden incluir, por ejemplo, células en las que se ha inducido o mantenido la quiescencia usando los métodos de la presente invención. En consecuencia, las células en las que puede inducirse la proliferación de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento pueden incluir células madre mesenquimales (CMM) derivadas de médula ósea, células madre renales, células madre hepáticas, células madre derivadas de músculo esquelético, células madre derivadas de hueso, CMM de pulpa dental, CMM derivadas de músculo cardíaco, CMM derivadas de líquido sinovial, CMM de cordón umbilical y otros tipos de células que puede identificar un experto en la materia a la luz de la presente memoria descriptiva.

La proliferación de células madre de acuerdo con la divulgación es reversible, permitiendo que se induzcan estados alternos de quiescencia y proliferación en una célula. Por ejemplo, los métodos descritos en el presente documento pueden usarse para inducir y mantener la quiescencia 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. Después, puede inducirse la 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. Después, la quiescencia puede inducirse 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.

En otra realización, la proliferación de células madre se induce en un estado quiescente de acuerdo con un método descrito en el presente documento. Después, puede inducirse que estas células quiescentes proliferen, como se ha descrito anteriormente.

La presente invención proporciona además métodos para inducir la diferenciación de una célula madre somática en la que la actividad biológica se está manteniendo y se ha inducido la quiescencia o se está manteniendo 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 frente 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 puesta en 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 tiene una elasticidad menor que la elasticidad del microambiente natural de la célula diana de diferenciación pretendida.

Puede inducirse diferenciación en células madre quiescentes 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 analiza 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 a partir de esta memoria descriptiva o como se describe en esta memoria descriptiva, con respecto a la reología de diversos tipos de tejidos, así como el medio de diferenciación a usar para inducir que las células madre se diferencien en diversos tipos de células, resultaría evidente para los expertos en la materia que los métodos de la presente invención pueden usarse para inducir que una célula madre mesenquimal derivada de médula ósea

humana se diferencie en uno o más de al menos los siguientes tipos de células: osteoblastos, condrocitos, miocitos, adipocitos, células de los islotes beta pancreáticos y células neuronales. Más generalmente, usando información sobre reología de diversos tipos de tejidos 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 los islotes beta pancreáticos, una célula neuronal u otro tipo de célula.

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 (balo contenido en glucosa), 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.

En el presente documento también se describe un sistema artificial para inducir o mantener la quiescencia y la integridad biológica sostenible de una célula madre somática. En realizaciones, el sistema incluye una sustancia de ligando de material extracelular (MEC) para poner en contacto una célula madre, un material sustrato unido a la sustancia de ligando de MEC y un medio para proporcionar nutrientes a la célula madre y mantener su actividad biológica. Cuando la sustancia de ligando de MEC 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 quiescencia en cualquiera de los tipos celulares en los que puede inducirse quiescencia de acuerdo con los métodos de la invención descritos en la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, pueden adaptarse realizaciones del sistema para inducir quiescencia en una célula madre somática o una célula madre embrionaria, una célula madre humana o una célula madre animal, una célula madre mesenquimal (CMM) somática, una CMM derivada de médula ósea, una célula madre renal, una célula madre derivada hepática, una CMM derivada de músculo esquelético, una CMM derivada de hueso, una CMM de pulpa dental, una CMM derivada de músculo cardíaco, una CMM derivada de líquido sinovial o una CMM de cordón umbilical.

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

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

En realizaciones, cuando la capa de ligando de MEC se acopla al sustrato, la capa de ligando de MEC tiene elasticidad aparente 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 MEC. Esta elasticidad aparente de la capa de ligando de MEC 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 MEC, y la capa de ligando de MEC 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 MEC se dispersa en la matriz. En realizaciones, un material de unión también puede dispersarse en la matriz del sustrato para unir el material de la matriz del sustrato con el MEC. 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 CMM derivadas de médula ósea con la estructura de poliacrilamida-NHS-fibronectina-colágeno, se induce a que entren en quiescencia. Cuando las CMM que entran en contacto con la estructura también están provistas de material nutriente adecuado, su actividad biológica se mantiene en un estado quiescente.

En realizaciones, el material sustrato forma una capa, y el MEC forma una capa unida, directa o indirectamente, con la capa de sustrato. En otras realizaciones, el material de unión forma una capa de unión que une la capa de ligando

de MEC con la capa de sustrato. La capa de unión puede actuar para presentar la elasticidad del sustrato a la capa de ligando de MEC de manera que permita que la capa de ligando de MEC presente esa elasticidad a la célula madre en la que se va a inducir quiescencia. En una realización, la capa de unión 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 sustrato es un gel de poliacrilamida. Como se conoce en la técnica, la elasticidad de los 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 geles de poliacrilamida u otros geles o materiales sustrato para su uso en los sistemas de la presente invención.

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 MEC como se ha descrito anteriormente, dejando las células reposar sobre la capa de MEC sumergiendo el sistema con células en medio, y colocando en las células otra capa de MEC con elasticidad aparente apropiada, como se describe adicionalmente en el Ejemplo 1.

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 frecuencia 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.

En otra realización, la célula diana de los métodos de la presente invención es una CMM inmortalizada.

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

En otra realización, la célula diana de los 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.

Como se proporciona en el presente documento, las células M2 mostraron un tamaño más grande y poblaciones celulares más grandes 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.

En el presente documento también se describe 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 los métodos de la presente invención, induciendo de este modo la detención del crecimiento de una célula transformada. En otra realización, en el presente documento se proporciona 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 los métodos de la presente invención, inhibiendo de este modo el crecimiento de una población de células transformadas. Cada posibilidad representa una realización distinta.

En otra realización, un sustrato blando de los 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.

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/cip1}. En otra realización, la inhibición de p21 activa las quinasas dependientes de ciclina (CDK). En otra realización, la activación de Rho induce la regulación negativa y degradación de p27^{Kip1}, 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 la transcripción de ciclina D1 mediada por Ras. En otra realización, esto induce la progresión de la fase G1. En conjunto, se mostró que la

- 5 activación de Rho conducía a progresión de la fase G1. En otra realización, la activación de Rac o de Cdc42 regula positivamente la ciclina E1 y ciclina D1, dando como resultado la progresión de la fase G1. En otra realización, la activación de una proteína de unión a GTP pequeña de la familia de 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.
- 10 En otra realización, un sustrato blando de los 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.
- 15 En otra realización, un sustrato blando de los 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.
- 20 En otra realización, una composición de los 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 conocido 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.
- 25 En la técnica se conocen bien 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 H₂O para producir un volumen final de 1.000 µl, la solución se transfiere con una pipeta a un cubreobjetos y sobre la solución se coloca un cubreobjetos superior, después, 10 minutos más tarde, se desprende. Cada método representa una realización distinta de la presente invención.
- 30 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, el sulfo-SANPAH se usa de la siguiente manera. Se disuelve sulfo-SANPAH 1 mg/ml en H₂O, y con una pipeta, se transfieren 200 µl de esta solución a la superficie del gel. El gel de poli(acrilamida) se coloca después debajo de una lámpara de luz ultravioleta a una distancia de 15,24 cm y se irradia durante 10 min. Después, se lava tres veces, utilizando, en cada lavado, 3 ml de HEPES 200 mM, pH 8,6. Después de aspirarse la última solución de HEPES, con una pipeta se transfieren 200 µl de una solución de fibronectina de pez 0,14 mg/ml (Sea Run Holdings, South Freeport, ME) o de 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 Para ensamblar un sistema como se ha descrito anteriormente o para llevar a cabo de otro modo los métodos de la presente invención, puede proporcionarse un kit de componentes. En una realización, dicho kit incluye como componentes distintos: (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 MEC para formar una capa de ligando de MEC. 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 a una elasticidad o a un intervalo de elasticidades predeterminados, 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 MEC y opcionalmente una capa de acoplamiento para acoplar el sustrato a la capa de ligando de MEC. Como resulta evidente para los expertos en la materia a la luz de la presente memoria descriptiva, para facilitar el almacenamiento, el envío y el ensamblaje de los kits, pueden combinarse diversos componentes de los kit descritos en el presente documento.
- 40 Las realizaciones de dicho kit también pueden incluir materiales para preparar y/o aplicar la capa de ligando de MEC. Por ejemplo, el kit puede incluir material de ligando de MEC para la aplicación directa al sustrato. En otras realizaciones, el kit puede incluir componentes individuales o ingredientes del material de la capa de ligando de MEC, 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
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

capa de ligando de MEC. En una realización específica, un kit de un sistema descrito en el presente documento para inducir quiescencia en una CMM derivada de médula ósea humana incluye lo siguiente:

(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 poliacrilamida con una dureza de aproximadamente 250 Pa para actuar como el sustrato, incluyendo cantidades apropiadas de acrilamida y bisacrilamida;

(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 MEC, incluyendo los materiales identificados en el Ejemplo 1, para preparar un material extracelular de fibronectina-colágeno 1:5.

En una realización, un kit de la presente divulgación comprende un gel de poliacrilamida formulado con una elasticidad para inducir quiescencia 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 preparar los usuarios) para inducir quiescencia en las células.

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

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

b) ligandos de MEC; y

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

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 que se produzcan daños al sistema. El kit puede expedirse a baja temperatura, tal como a una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C.

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 MEC 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.

Los métodos de la presente invención pueden llevarse a la práctica *in vivo* así como *ex vivo*. Dichos sistemas pueden incluir, por ejemplo, estructuras porosas para la inserción en tejidos específicos o en el sistema circulatorio para mantener una célula madre en quiescencia en el organismo. Por ejemplo, pueden dispersarse células madre, MEC correspondientes y, opcionalmente, material de unión, en una matriz polimérica que tiene elasticidad apropiada aparente para las células madre para inducir o mantener la quiescencia, 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 abandonen la matriz. Otras realizaciones pueden incluir casetes u otros dispositivos que inducen o mantienen la quiescencia de las células madre, y que pueden implantarse en un hospedador.

En el presente documento también se describe una célula madre quiescente 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 (CMM), CMM derivadas de médula ósea, una célula madre renal, una célula madre derivada hepática, una CMM derivada de músculo esquelético, una CMM derivada de hueso, una CMM de pulpa dental, una CMM derivada de músculo cardíaco, una CMM derivada de líquido sinovial o una CMM de cordón umbilical. En realizaciones, los métodos de la presente invención se usan para inducir o mantener una célula madre en un estado quiescente, y para mantener la actividad biológica de dichas células madre quiescentes.

En consecuencia, en el presente documento también se describe 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 I, con una fibronectina o con una combinación de los mismos.

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

5 Sección de detalles experimentales

Ejemplo 1: Medición de la rigidez de diversos tejidos y preparación de geles de poli(acrilamida) que se aproximan a las rigideces de los tejidos

10 Materiales y métodos experimentales

Preparación de geles de poli(acrilamida)

15 Se prepararon soluciones de acrilamida y bisacrilamida (Fisher Biotech, Loughborough, Leicestershire, UK) que contenían una masa polimérica constante de 7,5 % y concentraciones de bisacrilamida de 0,01 %, 0,03 % o 0,3 % para alterar la rigidez. La acrilamida, bisacrilamida, el persulfato de amonio y la N,N,N',N'-Tetrametilendiamina (TEMED) bajo una capa no acuosa de tolueno que contenía N-hidroxisuccinimida éster de ácido acrílico 0,5 % (Sigma, St. Louis, MS) se polimerizó entre dos cubreobjetos, modificados químicamente de la siguiente manera: 200 μ l de NaOH 0,1 N se transfirieron con pipeta para cubrir la superficie de un cubreobjetos de vidrio de 25 mm de diámetro (Fisherbrand, catalog n.º 12-545-102; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) durante 5 minutos. La solución de NaOH se aspiró, y se aplicaron 200 μ l de 3-APTMS (3-aminopropiltrimetoxilano, Sigma N° 28-1778, St. Louis, MO) durante 3 min. El portaobjetos de vidrio se aclaró cuidadosamente con agua desionizada para retirar mediante lavado cualquier resto de solución de 3-APTMS y se añadieron 200 μ l de glutaraldehído al 0,5 %v (Sigma N° G7651) en H₂O sobre el cubreobjetos durante 20 minutos. El cubreobjetos de vidrio se aclaró con agua, se colocó un cubreobjetos de vidrio de 18 mm de diámetro en la parte superior de un trozo de parafilm dentro de una placa de cultivo tisular, y se transfirieron con pipeta algunas gotas de una solución Surfasil al 10 % en volumen (Pierce no. 42800, Pierce, Rockford, IL) en cloroformo sobre el parafilm cerca del cubreobjetos. La placa de cultivo tisular con una tapa medio cerrada se colocó dentro de un evaporador al vacío durante 10 minutos.

30 El N-succinimidil acrilato incorporado en la superficie del gel se hizo reaccionar con 0,2mg/ml de laminina (Collaborative Biomedical, Bedford, MA) para producir un recubrimiento uniforme de ligandos adhesivos. Después de lavar con tampón HEPES para retirar trazas de disolvente no-polimerizado, los pocillos que contenían los geles de poli(acrilamida) (PA) se cargaron con medio de cultivo y se permitió que se equilibrasen durante una noche a 35 °C.

35 *Caracterización viscoelástica de armazones materiales*

Los módulos de cizalla dinámica de los geles se midieron en un espectrómetro de fluido reométrico III, controlado por tensión (Rheometrics, Piscataway, NJ). Una muestra de 500 μ l se polimerizó entre dos placas de acero, y el módulo de cizalla $G'(\omega)$, que describe la resistencia elástica, se calculó a partir de la tensión de cizalla en fase con un esfuerzo de cizalla osciladora del 2 % (1 rad/s). Los módulos de cizalla dinámica de los tejidos se midieron de manera similar. Se cortó una muestra de 8 mm de diámetro usando un punzón de acero inoxidable y se colocó entre las placas. El $G'(\omega)$ prolongado se midió por oscilación a una tensión del 2 % y el módulo de cizalla $G(t)$ prolongado se midió aplicando una tensión continua al 10 % y permitiendo que la muestra reposara durante 30 segundos.

45 RESULTADOS

Se prepararon geles de poli(acrilamida) y se recubrieron con una mezcla de 0,14 mg/ml de colágeno de tipo I y 0,14 mg/ml de fibronectina de pez. Ajustando la concentración de acrilamida y bisacrilamida, se consiguió un amplio intervalo de rigidez (Figura 1A). La rigidez de los geles de poli(acrilamida) no afecta a la cantidad ni a la distribución de la matriz extracelular en los geles. Se usó también reometría *in vitro* para determinar las propiedades elásticas de los tejidos relevantes para las células madre mesenquimales (Tabla 1). Se prepararon geles de poli(acrilamida) con G' de 200 Pa (en el presente documento usados como un ejemplo de "geles blandos" y denominados como tal) o 7.500 Pa (en el presente documento usados como un ejemplo de "geles rígidos" y denominados como tal); los geles blandos imitan la rigidez de los tejidos grasos y de médula ósea.

Tabla 1. Rigidez de los tejidos. Se obtuvieron tejidos de rata de tres ratas Sprague-Dawley.

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

Por lo tanto, se prepararon geles de poliacrilamida que imitaban la rigidez de tejidos biológicos.

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

5 MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

Se sembraron de forma dispersa CMMh en geles rígidos o geles blandos recubiertos con colágeno de tipo I 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.

10

RESULTADOS

Se investigó el efecto de la rigidez de la matriz extracelular en la forma y la estructura de F-actina de CMMh (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 la propagación. Las CMMh sembradas en geles rígidos o vidrio adoptaron una forma ahusada 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 un aspecto redondeado, carecían de fibras de tensión y contenían agregados de F-actina (Figura 1B-C).

15

20

Por lo tanto, las CMMh 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 CMMh en geles blandos.

25 MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

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

30

RESULTADOS

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

35

40

45

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

Ejemplo 4: Las CMMh en geles blandos son competentes para diferenciarse en adipocitos

50 MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

Estudios de diferenciación de adipocitos

Se sembraron CMMh de suspensiones celulares en placas de cultivo tisular de 96 pocillos recubiertas con colágeno de tipo I más fibronectina a una densidad de $3,5 \times 10^4$ células/pocillo. Después de incubar las células en DMEM que contenía FCS 10 % (medio de cultivo, "MC") durante 24 horas, se indujo la diferenciación de las células en adipocitos incubando durante 3 días (2 ciclos celulares) en medio de inducción adipogénico (MIA) (MC, dexametasona 1 μ M, indometacina 200 μ M, insulina 10 μ g/ml y metilisobutilxantina 0,5 mM) manteniendo después en medio de mantenimiento adipogénico (MC, insulina 10 μ g/ml). 8 días después de cambiar a MIA, 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 γ 2 usando anticuerpos contra PPAR γ 2. Se contaron más de 50 células tres veces en campos elegidos aleatoriamente. Los anticuerpos contra PPAR γ 2 los proporcionó el Dr. Mitchell A. Lazar, Universidad de Pensilvania.

55

60

65

RESULTADOS

- Para confirmar la viabilidad de las CMMh 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 γ 2), uno de los factores de transcripción clave para la adipogénesis, y (b) tinción con Oil Red O para medir la acumulación de lípidos. Cuando se indujo la diferenciación en adipocitos de CMMh confluyentes en una superficie de vidrio mediante una mezcla de dexametasona, indometacina, 3-isobutil-1-metil-xantina e insulina en medio que contenía 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 CMMh 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 CMMh podrían tener que dejar el ciclo celular como un requisito previo para la diferenciación terminal.
- Por lo tanto, las CMMh sembradas de forma dispersa en geles blandos son completamente viables y son competentes para la diferenciación de adipocitos.

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

- Para caracterizar adicionalmente y cuantificar la respuesta de las 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 extrajeron embriones (E17-E19) por cesárea de una rata Sprague-Dawley con gestación programada y se retiraron las cortezas. El tejido se digirió con tripsina/DNasa a 37 °C, se centrifugó (1000 g x 5 min), y se filtró para dar 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 las neuronas. Los cultivos usados para los experimentos fueron > 98 % de astrocitos como se determinó por inmunocitoquímica de GFAP. Las células se cultivaron en una incubadora a 37 °C y con CO $_2$ 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 mcg/ml y penicilina 50 unidades/ml.
- Las células se incubaron en presencia de suero en geles de poli(acrilamida) rígidos (11 kPa) o blandos (150 Pa) durante 48 horas para permitir la adherencia y propagación. 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 los astrocitos sembrados en geles rígidos. Por el contrario, en astrocitos sembrados en geles blandos, no había fibras de tensión y solamente se observaron carcasas de actina cortical. Por lo tanto, los astrocitos sembrados 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 de RHO en astrocitos sembrados en geles blandos

MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

- Ensayo de extracción de rhotexina

- 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 $_2$ 10 mM, 10 μ 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 μ 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 $_2$ 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-rhotexina y un ensayo de extracción de rhotexina. Se calculó la relación de Rho unido a GTP frente al total. Los astrocitos sembrados en geles blandos mostraron un bajo nivel de Rho unido a GTP (Figura 5), lo que indica la atenuación de la actividad de Rho en astrocitos sembrados en una matriz blanda, que da como resultado la ausencia de fibras de tensión en las células.

Ejemplo 7: Las células de melanoma modulan su propagación, basándose en la rigidez en la matriz extracelular

MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

5 Se sembraron de forma dispersa células M2 en matrices de diversas rigideces recubiertas con una mezcla de colágeno de tipo I 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

10 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 sobre la propagación 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
15 ejemplo, propagación celular) de acuerdo con las propiedades mecánicas de la matriz.

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

20 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 I 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
25 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.

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

Ejemplo 9: Uso de geles blandos para la conservación prolongada de CMMh sin atenuar la viabilidad y la autorrenovación

35 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 I y fibronectina en cubreobjetos de vidrio como se ha descrito en 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 los
40 geles de poli(acrilamida), o de los cubreobjetos de vidrio. Se siembran 5×10^4 CMMh de pase 2 en geles de poli(acrilamida) blandos o directamente en placas de cultivo tisular de 6 pocillos recubiertas con colágeno de tipo I más fibronectina, y se incuban en DMEM complementado con suero de ternero fetal (FCS) 10 %. Se suspenden muestras de CMMh 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
45 directamente en placas de cultivo tisular se tripsinizan y se subcultivan en nuevas placas de cultivo tisular de 6 pocillos a una densidad de 5×10^4 células/pocillo. Las células en las 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 CMMh mantenidas en placas de cultivo tisular alcanzan el pase 10, se descongelan CMMh reservadas en vapor de nitrógeno líquido para generar una
50 suspensión celular.

RESULTADOS

55 Para determinar la viabilidad de CMMh sometidas a conservación prolongada en un estado quiescente en geles blandos, se almacenan CMMh en geles blandos hasta que las CMMh mantenidas en placas de cultivo tisular alcanzan el pase 10. La viabilidad de estas células se compara con la de las células reservadas en vapor de nitrógeno líquido. Las células adheridas a geles blandos o a placas de cultivo tisular se tripsinizan, mientras que las células almacenadas en nitrógeno líquido se descongelan, para generar una suspensión celular. La viabilidad se
60 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 CMMh.

Para medir la fuerza de proliferación de las CMMh almacenadas en incubación prolongada en geles blandos, se preparan células que se han mantenido en geles blandos, en placas de cultivo tisular, o que se han mantenido
65 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 I 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).

Ejemplo 10: Uso de geles blandos para la conservación prolongada de CMMh sin atenuar la diferenciación

5 MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

Ensayos de diferenciación de osteoblastos

10 Suspensiones de CMMh de pase 10 se siembran en placas de cultivo tisular de 96 pocillos recubiertas con colágeno de tipo I más fibronectina a una densidad de 10^3 células/pocillo. Después de incubar las células en MC durante 24 horas, se induce la diferenciación de las células en osteoblastos cambiando el medio a medio de inducción osteogénico (MIO) (MC, ácido ascórbico-2-fosfato 50 μ 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

20 A continuación, se mide la fuerza de diferenciación de CMMh sometidas a conservación prolongada en un estado quiescente en geles blandos. Se tripsinizan CMMh almacenadas en geles blandos o en placas de cultivo tisular para realizar suspensiones generadas; en paralelo, se preparan suspensiones celulares descongelando las CMMh mantenidas congeladas en nitrógeno líquido. La diferenciación de adipocitos se evalúa como se ha descrito en el Ejemplo 4.

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

30 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.

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

35 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

40 *Ensayos de la familia de Rho*

Se preparan geles de poli(acrilamida) 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 I y fibronectina. Se colocan geles de poli(acrilamida) 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 poli(acrilamida) o cubreobjetos de vidrio. Se siembran 5×10^4 CMMh en un gel de poli(acrilamida) 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

55 Se clona ADNc para la GTPasa Rho candidata a partir de una genoteca 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 a cada ADNc se le añade una secuencia que codifica un marcador de myc. Se crea un adenovirus recombinante que expresa proteínas de la familia Rho mutantes y se usa para sobreexpresar las proteínas mutantes en CMMh.

RESULTADOS

60 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 CMM cultivadas en geles blandos o rígidos. Se identifican proteínas de la familia Rho adicionales implicadas en la trasmisión de estas señales.

65 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 CMMh. Se utiliza adenovirus recombinante que expresa

LacZ como un control negativo. Se preparan CMMh 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 inmunotienen 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 CMMh. 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 CMMh por rigidez de matriz.

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

Para estudiar el papel de la actomiosina en la regulación del crecimiento de CMMh en geles blandos antes de comprometerse a linajes celulares específicos, las CMMh se siembran en cubreobjetos de vidrio recubiertos con una mezcla de colágeno de tipo I y fibronectina durante 24 horas, después se incuban con BrdU en presencia o ausencia de 2,3-butanodiona monoxima (BDM) 20 mM, blebistatina 100 μ M o citocalasina D (CD) 0,25 μ 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 inmunotienen con respecto a BrdU. Se evalúa el efecto en el crecimiento de CMMh 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 CMMh en geles de fibrina tridimensionales blandos

MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

Reparación y siembra de geles de fibrina

Se rehidrata fibrinógeno de salmón (Searun Holdings, Freeport, ME) en H₂O 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 (μ l) con 2 unidades/ml de trombina de pez (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. Antes de la polimerización, se mezclan 10⁴ CMMh con solución de fibrinógeno en DMEM que contiene FCS 10 %, en el que las células se incuban durante 24 horas.

RESULTADOS

El análisis de proliferación de CMM en geles blandos y rígidos de fibrina se evalúa incubando células durante 12 horas adicionales en presencia de suero y BrdU, seguido de fijación e inmunotinción para la incorporación de BrdU.

La fuerza de diferenciación de CMMh en geles de fibrina se evalúa a través de la eficacia de la diferenciación de adipocitos. Se induce la diferenciación de CMM en geles de fibrina en adipocitos cambiando el medio a Medio de Inducción Adipogénico ("MIA" DMEM + FBS 10 %, dexametasona 1 micromolar (μ M), indometacina 200 μ M, insulina 10 microgramos (μ g)/ml y metilisobutilxantina 0,5 mM) durante 3 días, manteniendo después las células en Medio de Mantenimiento Adipogénico (MC, insulina 10 μ 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 γ 2. Se comparan los porcentajes de células positivas para tinción con Oil Red O o tinción con PPAR γ 2 entre geles de fibrina blandos y rígidos.

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

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

Se siembran suspensiones de CMM de pase 10 en placas de cultivo tisular de 96 pocillos recubiertas con colágeno de tipo I más fibronectina a una densidad de 10³ células/pocillo. Después de incubar las células en MC durante 24 horas, las células se cultivan en presencia de un gel blando 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 CMMh directamente en el gel blando, sin siembra previa en placas de cultivo tisular y tripsinización.

Habiéndose descrito las realizaciones preferidas de la invención con referencia a los dibujos acompañantes, ha de entenderse que la invención no está limitada a las realizaciones en concreto y que los expertos en la materia pueden efectuar diversos cambios y modificaciones en la misma sin alejarse del alcance de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método de inducción de la diferenciación de una población de células madre mesenquimales quiescentes en una población de un tipo de célula de interés, comprendiendo dicho método las etapas de (a) mantener dicha población de células madre mesenquimales en quiescencia, conservando la capacidad de que dicha población de células madre mesenquimales se diferencie en múltiples tipos de células y conservando la capacidad proliferativa de dicha población de células madre mesenquimales en presencia de un aparato que contiene un gel o una matriz de gel que tiene un módulo de cizalla en un intervalo de 150-750 Pa; y (b) cultivar dicha población de células madre mesenquimales en presencia de un medio de inducción, induciendo de este modo la diferenciación de dicha población de células madre mesenquimales en una población de un tipo de célula de interés.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha población de un tipo de célula de interés es una población de adipocitos.
3. El método de la reivindicación 1, en el que dicha población de un tipo de célula de interés es una población de osteoblastos.
4. El método de la reivindicación 1, en el que
- (a) dicho gel o matriz de gel comprende además un suero animal; y/o
- (b) la etapa de mantenimiento de 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
- (c) la etapa de mantenimiento se realiza directamente después del aislamiento, la purificación o el enriquecimiento de dicha población de células madre mesenquimales a partir de una muestra biológica.
5. El método de la reivindicación 1, en el que el medio de inducción es un medio de inducción adipogénico.
6. El método de la reivindicación 1, en el que
- a) dicho gel o matriz de gel comprende acrilamida y bisacrilamida; y/o
- b) dicho gel o la matriz de gel es bidimensional o tridimensional; y/o
- c) dicho gel o la matriz de gel se recubre con una proteína de adhesión; y/o
- d) dicha población de células madre mesenquimales es una población de células madre mesenquimales adultas; y/o
- e) dicha población de células madre mesenquimales es una población de células madre mesenquimales humanas.
7. El método de la reivindicación 6, en el que
- (a) dicho gel o el gel en dicha matriz de gel tiene una concentración total de acrilamida de 3 % y una concentración total de bisacrilamida de 0,06 % a 0,5 %, una concentración total de acrilamida de 5,5 % y una concentración total de bisacrilamida de 0,05 % a 0,075 % o una concentración total de acrilamida de 7,5 % y una concentración total de bisacrilamida de 0,01 % a 0,03 %; y/o
- (b) dicha proteína de adhesión es un colágeno, una fibronectina, o una combinación de los mismos.

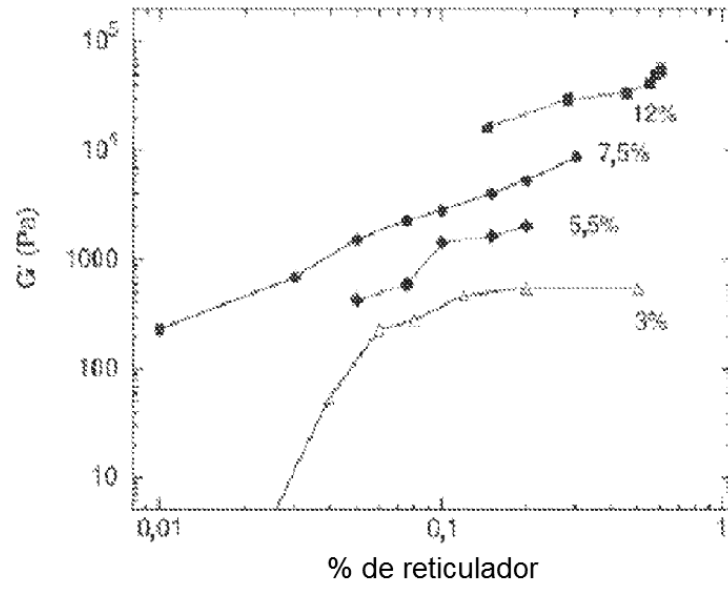


FIGURA 1A

gel rígido

gel blando

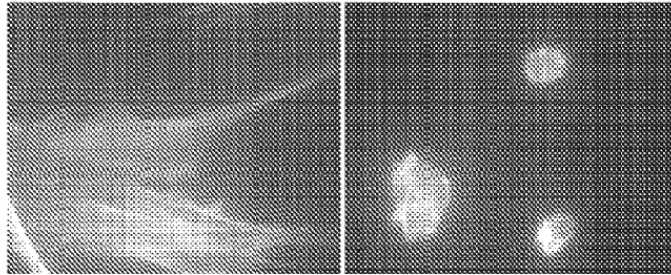


FIGURA 1B

VIDRIO

GEL BLANDO

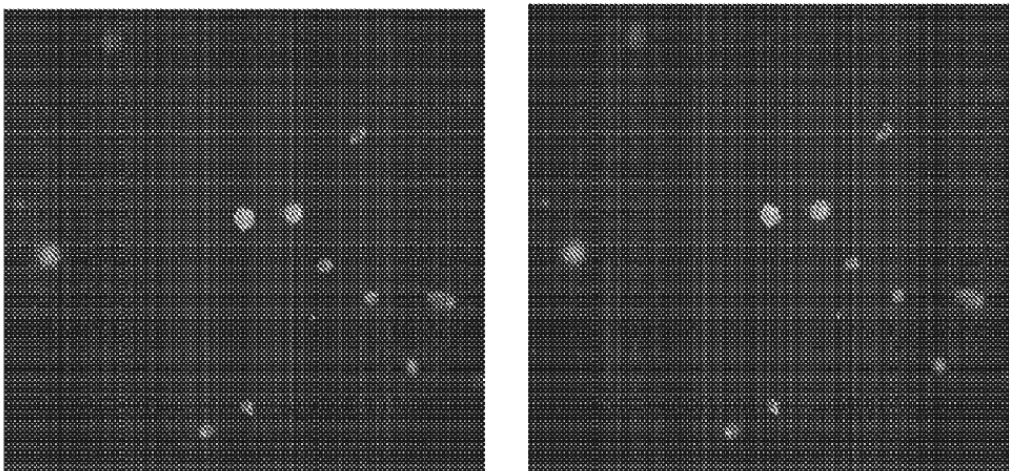


FIGURA 1C

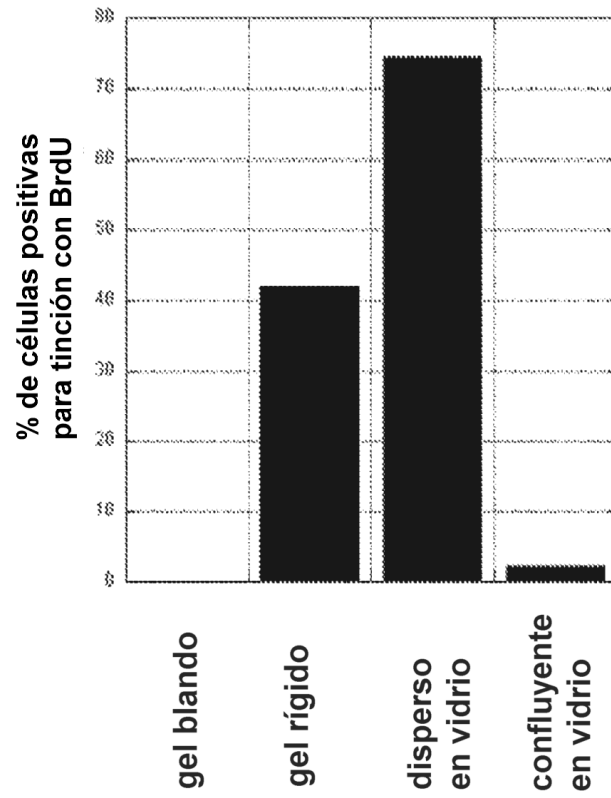


FIGURA 2

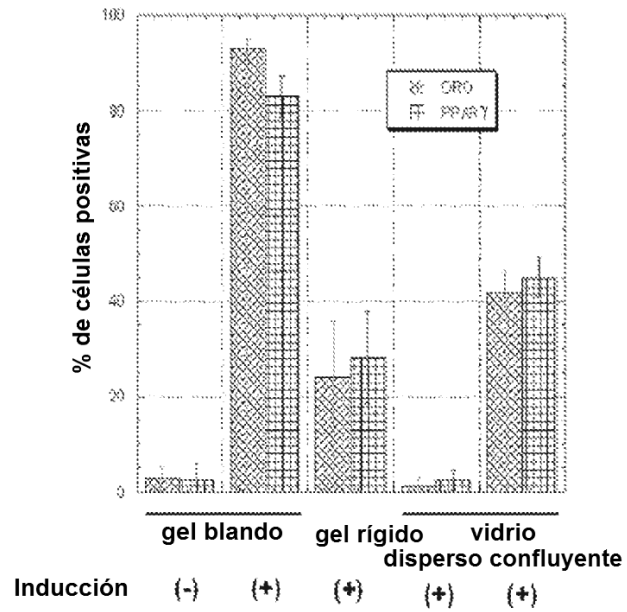


FIGURA 3A

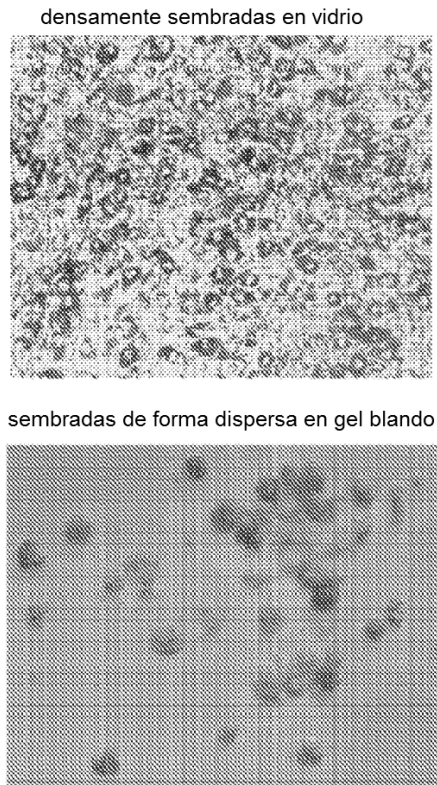


FIGURA 3B

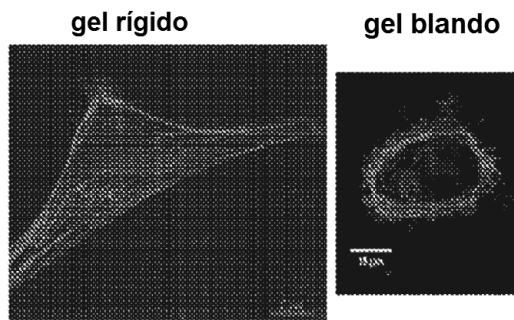


FIGURA 4

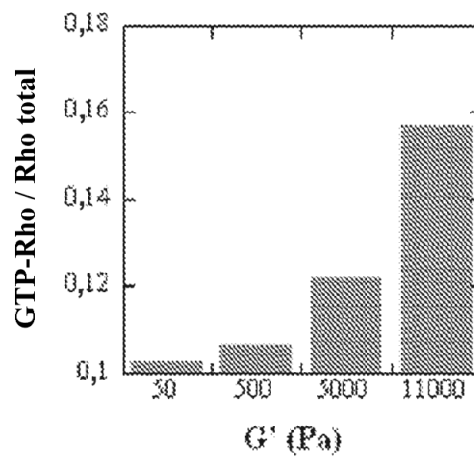


FIGURA 5

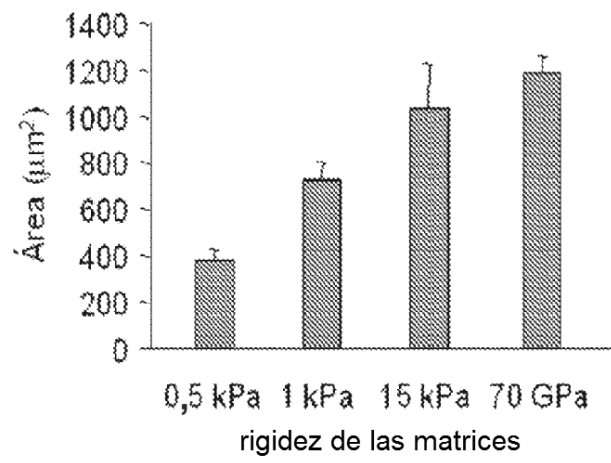


FIGURA 6

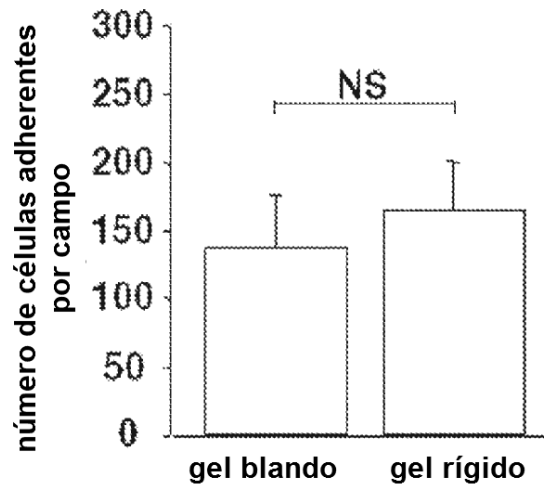


FIGURA 7

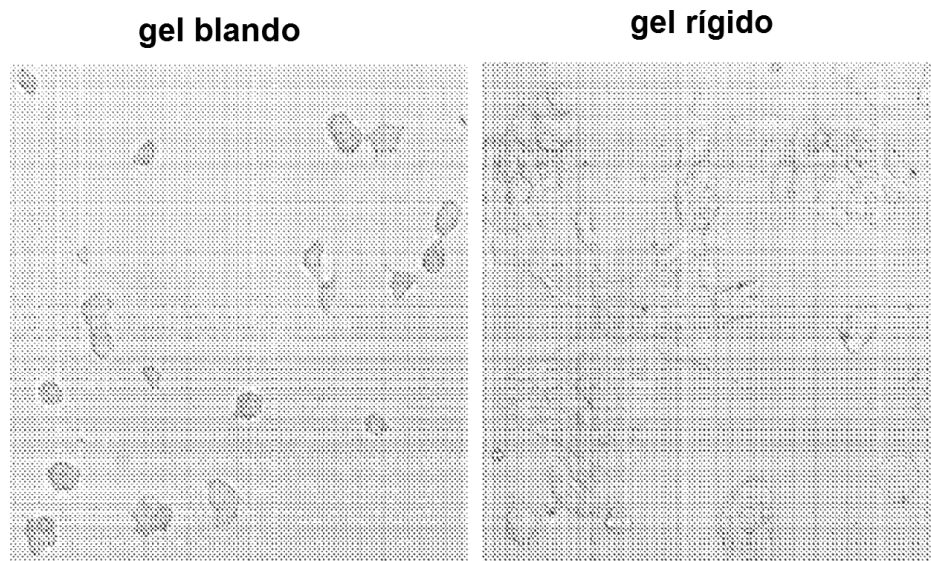


FIGURA 8

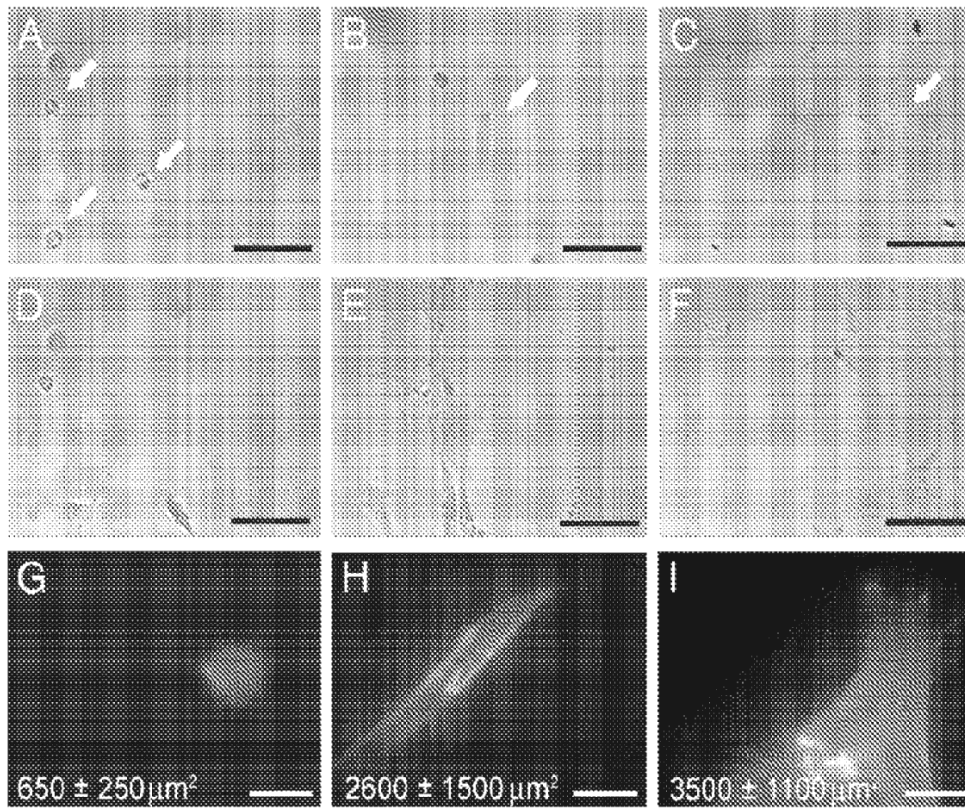


FIGURA 9A-9I

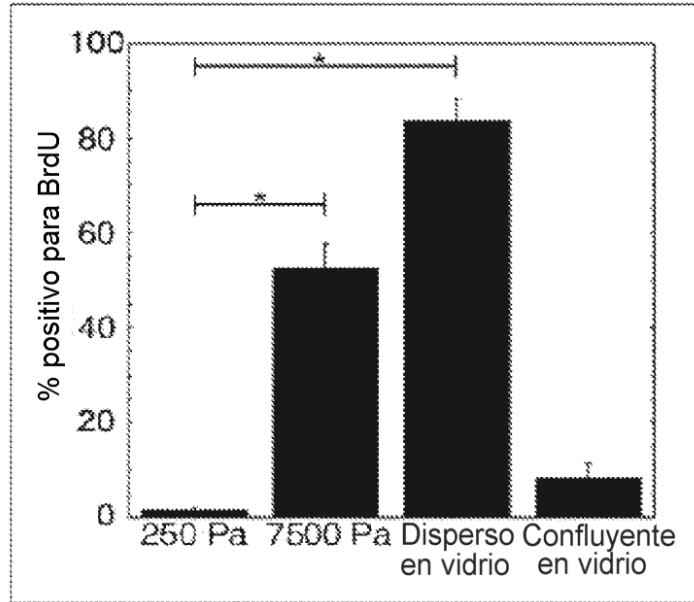


FIGURA 10

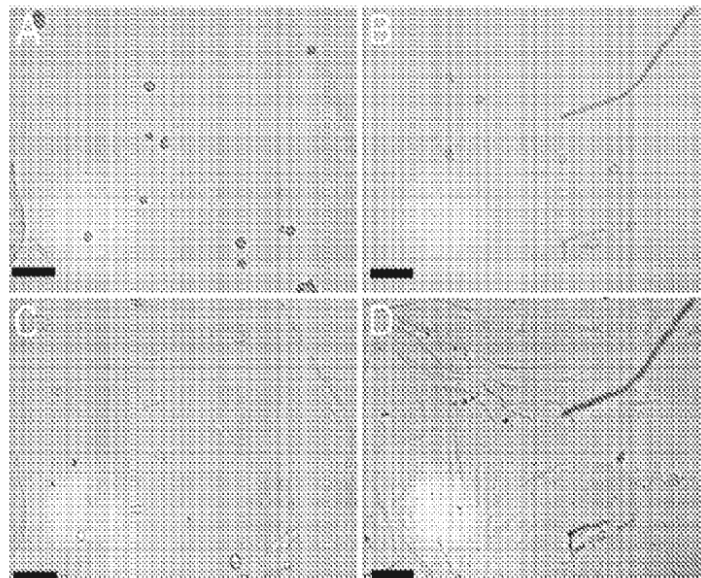


FIGURA 11A-11D

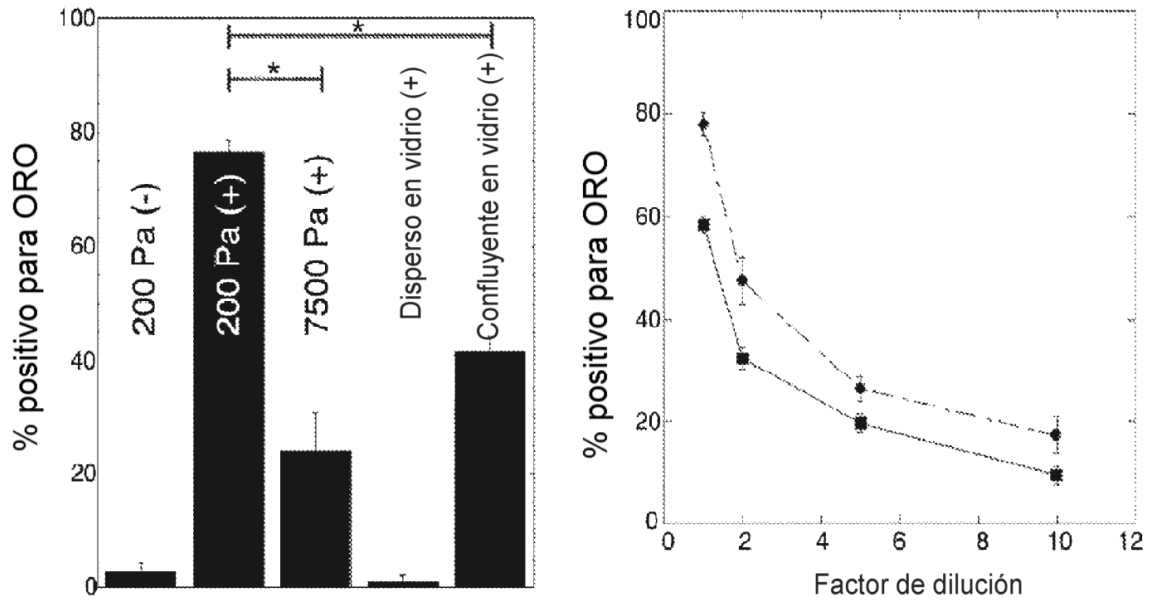


FIGURA 12

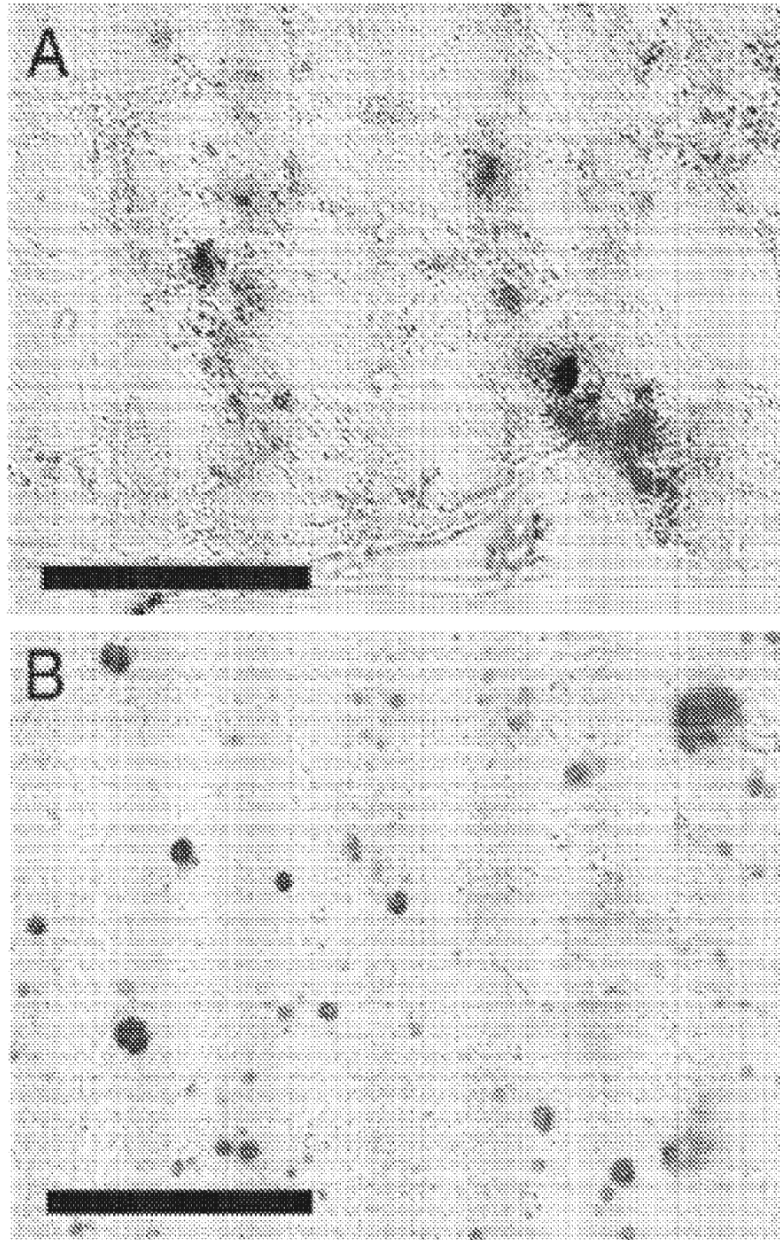


FIGURA 13A-B

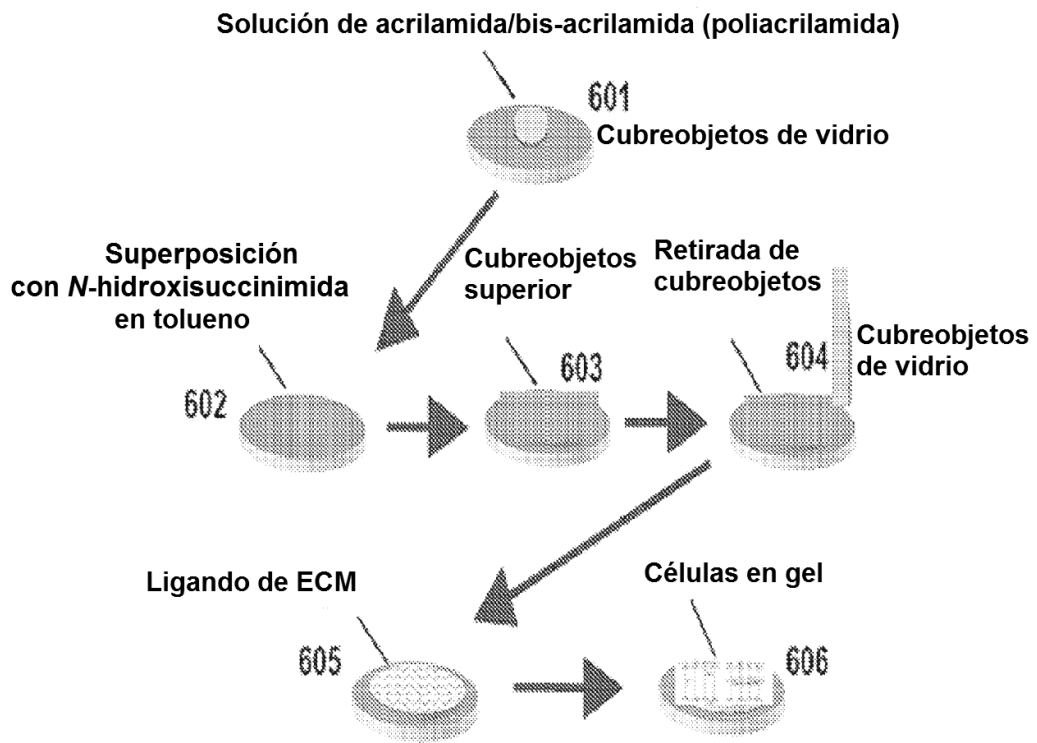
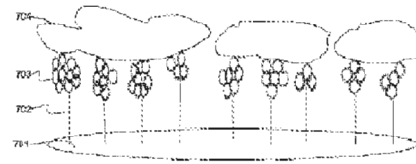
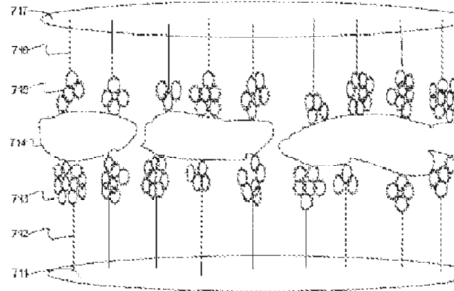


Figura 14



B



B

FIGURA 15