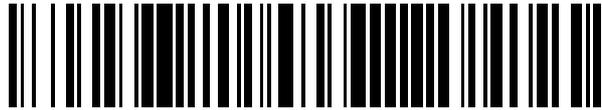


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 580 377**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2012 E 12725468 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2723850**

54 Título: **Método para cultivar células en un medio que contiene lisado de plaquetas**

30 Prioridad:

27.06.2011 EP 11171595

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

23.08.2016

73 Titular/es:

**RHEINISCH-WESTFÄLISCHE TECHNISCHE
HOCHSCHULE (RWTH) AACHEN (100.0%)
Templergraben 55
52056 Aachen, DE**

72 Inventor/es:

**WAGNER, WOLFGANG y
WALENDA, GUDRUN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 580 377 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para cultivar células en un medio que contiene lisado de plaquetas

Antecedentes de la invención

5 La invención se refiere a un método para cultivar células adherentes utilizando un medio líquido que comprende un lisado de plaquetas sanguíneas y una sustancia inhibidora de la gelatinización. La invención se refiere además a un sistema de dos fases y un gel para cultivar células.

Técnica previa

10 Normalmente se cultivan células en medios que están complementados con suero de ternera fetal (FCS; del inglés, fetal calf serum) u otros sueros sanguíneos con objeto de proporcionar factores de crecimiento esenciales a las células. Aunque en realidad no todos los tipos celulares necesitan suero para su crecimiento, la mayoría de los tipos celulares sensibles, por ejemplo, las células madre, aún dependen por ahora de medios que contienen suero. Sin embargo, a la luz de aplicaciones terapéuticas, hay un interés creciente por evitar el uso de FCS a causa de posibles reacciones inmunes xenogénicas (por ejemplo, anticuerpos anti-FCS), agentes patógenos bovinos (virus y priones) y una elevada variabilidad de lote a lote que impide la reproducibilidad de los resultados (Heiskanen et al., 2007; Sundin et al., 2007). Se dispone comercialmente ahora de medios de cultivo sintéticos químicamente definidos, pero su composición exacta a menudo está sin describir e incluyen a menudo otros componentes xenogénicos tales como factores de crecimiento recombinantes.

20 El lisado de plaquetas humanas (HPL; del inglés, human platelet lysate) representa otra atractiva alternativa al FCS. Se puede generar un HPL a partir de unidades de plaquetas comunes mediante un simple procedimiento de congelación-descongelación. Incluso es posible utilizar un HPL del mismo donante para minimizar más el riesgo de efectos inmunológicos secundarios o infecciones víricas. Estos estudios se llevaron a cabo con células estromales mesenquimáticas (MSC; del inglés, mesenchymal stromal cells) de médula ósea, y se ha demostrado recientemente que el HPL puede ser también empleado para el aislamiento de MSCs a partir de tejido adiposo humano (Blande et al., 2009).

25 Del Documento EP 0413727 B1 se conoce un método para preparar un lisado de plaquetas sanguíneas y un medio de HPL. De acuerdo con este conocido método, se añade citrato a sangre completa con objeto de evitar la coagulación. Se somete el plasma procedente de esta sangre a centrifugación con objeto de obtener una pasta rica en plaquetas, y luego se añade Ca^{2+} para lisar las plaquetas y hacer que se coagulen los componentes restantes. El lisado claro filtrado es mezclado con una composición nutriente convencional para obtener un medio que contiene HPL.

30 Además, en el Documento WO 2008/034803 A1 se describe un suplemento para medios de cultivo celular que comprende un lisado de plaquetas exento de plasma. El suplemento comprende además sustancias adicionales tales como albúmina y dextrano. Con objeto de preparar el suplemento, se lisan las plaquetas mediante congelación y descongelación de las mismas y se añade ácido-citrato-dextrosa (ACD) o citrato-fosfato-dextrosa (CPD; del inglés, citrate phosphate dextrose) como anticoagulante.

35 Sin embargo, muchas células, por ejemplo, las células estromales mesenquimáticas (MSCs), crecen en una monocapa adherente a plástico hasta que resultan inhibidas por contacto. Más pronto o más tarde la velocidad de proliferación de las células decae, hasta que las células alcanzan finalmente un estado senescente. Esto va acompañado de una morfología agrandada, una expresión reducida de marcadores superficiales y un potencial de diferenciación disminuido. Este proceso no tiene lugar en paralelo a través de células en cultivo a causa de diferentes subpoblaciones, apoptosis y por último, aunque no menos importante, inhibición por contacto dentro de las colonias. Una menor densidad de siembra facilita intervalos mayores para los subcultivos celulares, y, por lo tanto, la proliferación sólo puede tener lugar en el borde de las colonias más grandes. En consecuencia, cuando se utilizan cultivos de monocapas adherentes a plástico, apenas es posible realizar una expansión fiable y minimizar la inhibición por contacto. Además, tampoco es posible el subcultivo de células sin utilizar un tratamiento con peptidasas nocivo para las células. Con los cultivos de células madres, otra desventaja de los cultivos de monocapas adherentes a plástico es que la superficie del plástico puede causar una indeseada diferenciación de las células.

Sumario de la invención

50 El objeto de la invención es proporcionar un método para cultivar células adherentes y un sustrato para cultivo celular que permita una expansión fiable de células, con los que se minimice la inhibición por contacto y sea posible el subcultivo celular sin necesidad de un tratamiento enzimático.

55 El objeto se alcanza proporcionando un método que comprende cultivar las células sobre la superficie de, y/o dentro de, un sustrato tridimensional de tipo gel que comprende 1-40% (concentración volúmica) de lisado de plaquetas sanguíneas (BPL; del inglés, blood platelet lysate) pero que está sustancialmente desprovisto de una sustancia inhibidora de la gelatinización, en el que un medio líquido que comprende un lisado de plaquetas sanguíneas y una

5 sustancia inhibidora de la gelatinización se dispone como una capa sobre el sustrato de tipo gel. La gelatinización de un lisado de plaquetas sanguíneas puro o una composición que comprende lisado de plaquetas sanguíneas, que están exentos de toda sustancia inhibidora de la gelatinización tal como heparina, se produce espontáneamente a aproximadamente 37 °C en un plazo de una hora. Sorprendentemente, la adición de agentes inductores de la coagulación, tales como trombina y/o gluconato de calcio, no es necesaria para la gelatinización. Además, resulta que el sustrato de tipo gel resultante es un sustrato perfecto para expandir células adherentes, especialmente células estromales mesenquimáticas (MSCs) o fibroblastos. El uso de un sustrato de tipo gel que comprende lisado de plaquetas sanguíneas evita el riesgo de inmunorreacciones xenogénicas o la transmisión de agentes patógenos bovinos y también es más eficaz que el FCS para la expansión de células a gran escala, especialmente MSCs de tejido adiposo. Por ejemplo, el lisado de plaquetas humanas (HPL) aumenta significativamente la velocidad de proliferación y el número máximo de duplicaciones acumuladas de población de MSCs procedentes de tejido adiposo. De esta manera, el método de acuerdo con la invención permite una expansión fiable de células adherentes y una eficaz minimización de la inhibición por contacto ya que las células pueden crecer tridimensionalmente dentro del sustrato, es decir, en múltiples capas, mientras los factores de crecimiento están uniformemente disponibles en todas las direcciones. Además, es posible el subcultivo de células sin necesidad de un tratamiento enzimático, por ejemplo, una digestión con tripsina/EDTA, y una operación de centrifugación. Puesto que el sustrato de tipo gel es biocompatible y proporciona por ello un entorno fisiológico a las células, se minimiza el riesgo de toda influencia indeseada sobre las células. Por ejemplo, se puede evitar eficazmente una diferenciación indeseada de células madre. Además, el cubrimiento de la superficie del sustrato de tipo gel con un medio líquido que comprende lisado de plaquetas sanguíneas y una sustancia inhibidora de la gelatinización proporciona ventajosamente un entorno homogéneo a las células y, por lo tanto, asegura unas condiciones de cultivo óptimas.

En una realización preferida de la invención, el medio líquido y el sustrato de tipo gel, junto con la sustancia inhibidora de la gelatinización, tienen una composición sustancialmente idéntica, por lo que los factores de crecimiento y los nutrientes están uniformemente distribuidos por dentro de todo el sistema de cultivo e incluso las células sobre la superficie del sustrato de tipo gel pueden ser cultivadas bajo condiciones homogéneas.

En una realización de la invención, el subcultivo o la recolección de las células se llevan a cabo mediante degradación enzimática del sustrato de tipo gel, preferiblemente utilizando una peptidasa, en particular plasmina. Alternativamente, el subcultivo o la recolección de las células se pueden llevar a cabo por fragmentación mecánica de la estructura de tipo gel, preferiblemente por pipeteo, seguido opcionalmente de un tratamiento con tripsina/EDTA o un tratamiento con EDTA para singularización de las células. Sin embargo, puesto que incluso un simple pipeteo sin ningún tratamiento enzimático es suficiente con el método de acuerdo con la invención, se puede evitar el uso de cualquier enzima durante el subcultivo celular.

Preferiblemente, la sustancia inhibidora de la gelatinización comprende heparina o una heparina de bajo peso molecular (LMWH; del inglés, low molecular weight heparin) tal como Clexane[®] (Sanofi-Aventis, París, Francia). En una realización preferida de la invención, el medio líquido comprende 0,1-100 U/ml de heparina como sustancia inhibidora de la gelatinización, preferiblemente 0,1-10 U/ml, en particular 0,2-5 U/ml. Si se emplea Clexane[®], esta LMWH se puede proporcionar preferiblemente en una concentración de 0,001-1 mg/ml, preferiblemente de 0,005-1 mg/ml, en particular de 0,005-0,5 mg/ml.

En otra realización preferida, tanto el medio líquido como el sustrato de tipo gel están sustancialmente desprovistos de suero con el fin de evitar cualquier reacción inmune xenogénica o cualquier infección patogénica. De esta manera, el método de acuerdo con la invención es adecuado para proporcionar células para aplicaciones terapéuticas.

Preferiblemente, las células son células madre o progenitoras; son particularmente preferidas las células madre mesenquimáticas, en particular las células estromales mesenquimáticas. En otra realización preferida de la invención, las células son células mesodérmicas, preferiblemente fibroblastos o células estromales mesenquimáticas. Pero, obviamente, el método de acuerdo con la invención puede ser también adecuado para cultivar otros tipos de células, tales como, por ejemplo, células procedentes de linajes ectodérmicos o endodérmicos. Además, el método de acuerdo con la invención es bien adecuado para cultivar células primarias.

El objeto se alcanza además mediante un método para producir un sustrato tridimensional de tipo gel, método que comprende:

- a) proporcionar un concentrado de trombocitos;
- b) recolectar plaquetas sanguíneas de dicho concentrado;
- c) lisar las plaquetas sanguíneas;
- d) añadir al menos un componente de medio al lisado para obtener un medio que comprenda 1-40% de lisado de plaquetas sanguíneas; y
- e) dejar que el medio de lisado de plaquetas sanguíneas se gelatinice a aproximadamente 37 °C con objeto de obtener un sustrato de tipo gel que comprenda un lisado de plaquetas sanguíneas.

Sorprendentemente, resulta que el lisado de plaquetas sanguíneas, sea puro o sea diluido, se gelatiniza espontáneamente a aproximadamente 37 °C sin necesidad de añadir ningún agente inductor de la coagulación tal como, por ejemplo, trombina y/o gluconato de calcio.

5 En una realización preferida de este método, el componente de medio comprende una composición de medio normalizada para cultivo celular, preferiblemente medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; del inglés, Dulbecco's modified Eagle medium), en particular DMEM con bajo contenido en glucosa (DMEM-LG; del inglés, DMEM-low glucose). De este modo, se proporciona un medio que contiene factores de crecimiento esenciales y todos los nutrientes necesarios para cultivos celulares sin componentes séricos indeseados.

10 De acuerdo con una realización preferida de la invención, el sustrato puede comprender 5-40% de lisado de plaquetas sanguíneas, más preferiblemente 5-20% de lisado de plaquetas sanguíneas, en particular aproximadamente 10-20% de lisado de plaquetas sanguíneas. Por ejemplo, el sustrato de tipo gel de acuerdo con la invención puede consistir esencialmente en 10% de HPL, 89% de DMEM y L-glutamina 2 mM.

15 El objeto se alcanza además mediante un sistema de dos fases que comprende (a) un medio líquido que comprende un lisado de plaquetas sanguíneas y una sustancia inhibidora de la gelatinización, y (b) un sustrato tridimensional de tipo gel que comprende 1-40% de lisado de plaquetas sanguíneas pero que está sustancialmente desprovisto de una sustancia inhibidora de la gelatinización.

En una realización preferida de este sistema de dos fases, el medio líquido y el sustrato de tipo gel, junto con la sustancia inhibidora de la gelatinización, tienen composiciones sustancialmente idénticas. Preferiblemente, la sustancia inhibidora de la gelatinización en la fase líquida del sistema de dos fases comprende heparina.

20 La invención se describe además con detalle por referencia a las figuras.

Breve descripción de las figuras

25 En la **Figura 1** se muestra una representación esquemática de disposiciones experimentales para demostrar la invención. Se cultivan células, ya sea convencionalmente de forma directa sobre plásticos para cultivo celular o ya sea sobre un gel de acuerdo con la invención que comprende un lisado de plaquetas humanas (HPL) pero que está desprovisto de heparina. El medio líquido para cultivo contiene componentes esencialmente idénticos pero incluye además heparina para inhibir la coagulación. Las células pueden ser recolectadas por degradación del gel de HPL usando plasmina o mediante pipeteo.

30 En la **Figura 2** se muestra un diagrama de barras que demuestra la proliferación de células estromales mesenquimáticas (MSCs) sobre diferentes superficies (barras blancas: superficie de plástico; barras grises: gel de colágeno; barras negras: gel de HPL). Se cultivaron MSCs en un medio de cultivo que comprendía diferentes concentraciones de lisado de plaquetas humanas (HPL) y se determinó el número de células después de siete días utilizando un ensayo MTT. La concentración de HPL dentro del gel era respectivamente consistente con la concentración de HPL en el medio líquido. La proliferación celular en gel de HPL muestra diferencias significativas en comparación con la proliferación sobre plásticos y gel de colágeno (n = 5).

35 En la **Figura 3** se muestra un diagrama de barras que demuestra la proliferación de células estromales mesenquimáticas (MSCs) en diferentes métodos de subcultivo celular con un gel que comprende lisado de plaquetas humanas (HPL). Se cultivaron MSCs durante siete días sobre geles de HPL y, con fines de comparación, sobre plásticos para cultivo celular. Las células se recolectaron utilizando tratamiento con plasmina o pipeteo, con o sin el subsiguiente tratamiento con tripsina/EDTA o con EDTA, respectivamente, y se transfirieron luego a una nueva placa para cultivo celular que contenía medio sin HPL. Después de un día más de cultivo se determinó el número de células mediante un ensayo MTT. Con fines de control, los valores resultantes (barras negras) fueron normalizados con respecto a los valores en el plástico para cultivo celular (barras blancas, OD590 = 1). N = 3; se indica la desviación estándar.

A: Cultivo sobre plásticos; subcultivo mediante tripsina/EDTA

45 B: gel de HPL; subcultivo mediante pipeteo

C: gel de HPL; subcultivo mediante pipeteo y tratamiento con EDTA

D: gel de HPL; subcultivo mediante pipeteo y tratamiento con tripsina/EDTA

E: gel de HPL; subcultivo mediante degradación del gel con plasmina

F: gel de HPL; subcultivo mediante degradación por plasmina y tratamiento con EDTA

50 G: gel de HPL; subcultivo mediante degradación por plasmina y tratamiento con tripsina/EDTA.

En la **Figura 4** se muestra un diagrama que ilustra la proliferación de células estromales mesenquimáticas (MSCs) procedentes de médula ósea (BM; del inglés, bone marrow) o tejido adiposo (AT; del inglés, adipose tissue) en

función de la concentración de heparina (U/ml) dentro del medio líquido. Se cultivaron MSCs durante siete días sobre geles de HPL cubiertos por un medio líquido de HPL que contenía diferentes cantidades de heparina. Se determinó el número de células después de siete días utilizando un ensayo MTT (OD a 590 nm).

5 En la **Figura 5** se muestra un diagrama que ilustra la proliferación de células estromales mesenquimáticas (MSCs) procedentes de médula ósea (BM) o tejido adiposo (AT) en función de la concentración de Clexane® [heparina de bajo peso molecular (LMWH) de Sanofi-Aventis, París, Francia] (mg/ml) en el medio líquido. Se cultivaron MSCs durante siete días sobre geles de HPL cubiertos por un medio de HPL líquido que contenía diferentes concentraciones de LMWH. Se determinó el número de células después de siete días utilizando un ensayo MTT (OD a 590 nm).

10 En la **Figura 6** se muestra un diagrama que representa la elasticidad de geles de HPL en función de la concentración de HPL (A) y fotomicrografías que demuestran que las MSCs crecen en la interfase entre el gel de HPL y el medio de HPL (B-E). Un medio para cultivo celular que contenía un lisado de plaquetas humanas sin sustancia inhibidora de la gelatinización (anticoagulante) se gelatinizó en pocillos de fondo plano para cultivo celular en las concentraciones indicadas. Cada concentración de HPL fue analizada en cuanto a elasticidad en dos muestras independientes con de una a tres mediciones por muestra. La elasticidad del sustrato de gel de HPL era muy baja y se correlacionaba con las concentraciones de HPL (A). Los valores de elasticidad medios se indican en forma de línea estrecha. A continuación se sembraron MSCs en la parte superior con el mismo medio de cultivo complementado con heparina. Unos cortes histológicos después de 4 días de cultivo revelaron un crecimiento celular en múltiples capas en la interfase entre el gel de HPL y el medio de HPL (B). Una microscopía electrónica de barrido (SEM; del inglés, scanning electron microscopy) demostró el andamio reticular de fibrina del gel de HPL (C). Las MSCs sobre plástico para cultivo tisular (TCP; del inglés, tissue culture plastic) (D) y sobre gel de HPL (E) mostraron la típica morfología de MSC en forma de huso.

25 En la **Figura 7** se muestran diagramas que demuestran la velocidad de proliferación y el aumento de frecuencia de unidades formadoras de colonias fibroblastoides (CFU-f; del inglés, fibroblastoid colony-forming units) sobre gel de HPL. Se sembraron MSCs en placas de 96 pocillos sobre TCP, gel de colágeno o gel de HPL en un medio de cultivo complementado con HPL al 1%, 5%, 10% o 20%. Después de 7 días se evaluó la proliferación mediante el ensayo MTT (por favor, adviértase que este ensayo proporciona una medida relativa que puede variar entre experimentos). En conjunto, el crecimiento celular resultó estimulado con las concentraciones mayores de HPL y resultó significativamente aumentado sobre el gel de HPL en comparación con el TCP y el gel de colágeno (A; n = 7).
30 Además, la proliferación de MSCs fue mayor sobre el gel de HPL que sobre el gel de fibrina (B; n = 3). También se observó un similar efecto sustentador del crecimiento del gel de HPL sobre fibroblastos dérmicos (C; n = 4). También se analizó la velocidad de proliferación de MSCs en el curso de la expansión del cultivo después de 2, 5, 7 y 9 días en HPL al 10% (D; n = 3). Para cuantificar la formación inicial de colonias sobre TCP o gel de HPL, se sembraron las células en dilución limitante en placas de 96 pocillos. Después de 14 días, se calificaron los pocillos en cuanto a la
35 formación de colonias utilizando el ensayo MTT y se determinó la frecuencia de CFU-f mediante una distribución de Poisson (E; n = 3); *P < 0,05, **P < 0,005, ***P < 0,0005.

En la **Figura 8** se muestra una representación esquemática de disposiciones experimentales (A) y diagramas que demuestran la expansión de cultivos y el subcultivo de MSCs en geles de HPL (B y C). Esquema de expansión de cultivos sobre TCP o gel de HPL: se subcultivaron continuamente MSCs sobre TCP después de alcanzar un nivel de confluencia de 80% con tripsina-EDTA. Al mismo tiempo se recolectaron células sobre el gel de HPL junto con el gel mediante pipeteo y resiembra sin separación de las MSCs de su matriz (A). Se llevó a cabo a la vez un cultivo de larga duración de MSCs con ambos métodos a lo largo de cuatro subcultivos consecutivos. Se calcularon las duplicaciones de población acumuladas (cPD; del inglés, cumulative population doublings) desde el primer subcultivo en adelante. Se muestran los datos representativos de tres experimentos independientes (B). Para la
40 comparación de los diferentes métodos de subcultivo, se cultivaron durante la noche 1000 MSCs sobre TCP o gel de HPL. Las MSCs sobre TCP fueron luego subcultivadas con tripsina, mientras que las células sobre gel de HPL fueron propagadas de vuelta al TCP mediante pipeteo, tratamiento adicional con tripsina/EDTA o incubación con plasmina. Después de un día más se midieron las células adherentes y no adherentes utilizando el ensayo MTT (C).

En la **Figura 9** se muestra una comparación de MSCs cultivadas sobre plástico para cultivo tisular y sobre gel de HPL. Las células fueron aisladas y expandidas para tres subcultivos sobre TCP, sobre gel de HPL o sobre gel de HPL con transferencia a TCP para un subcultivo adicional (A). Se presentan histogramas representativos para cada preparación celular. Todas las MSCs revelaron el mismo inmunofenotipo CD14⁺, CD31⁻, CD34⁻, CD45⁻, CD29⁺, CD73⁺, CD90⁺ y CD105⁺ sin diferencias significativas en la intensidad media de señal (n = 4; normalizada con respecto a la correspondiente autofluorescencia). Las MSCs aisladas sobre TCP o gel de HPL fueron luego sometidas a inducción hacia el linaje adipogénico (B) u osteogénico (C) sobre TCP convencional durante tres semanas, mientras que la diferenciación condrogénica fue inducida durante tres semanas en cultivo de sedimento (D). Se analizó la diferenciación mediante el colorante fluorescente verde BODIPY, mediante tinción con Rojo de Alizarina o mediante tinción con Azul Alcian, respectivamente. Se muestran los datos representativos de tres experimentos independientes. Barra de escala: 200 µm.

60 **Descripción de realizaciones ejemplares y preferidas de la invención**

Las células estromales mesenquimáticas (MSCs) son una población celular biológicamente importante que es capaz de sustentar la hematopoyesis, se puede diferenciar *in vitro* a lo largo de linajes mesenquimáticos y no mesenquimáticos, es capaz de suprimir alorrespuestas y parece ser no inmunogénica. Estas propiedades sugieren papeles emergentes para las células estromales mesenquimáticas en terapia celular.

- 5 Se aislaron MSCs de la cabeza del fémur después de una fractura de cadera, tras el consentimiento escrito usando las directrices aprobadas por el Comité de Ética de la Universidad de Aachen. Se lavaron fragmentos óseos con disolución salina tamponada con fosfato (PBS; del inglés, phosphate buffered saline) y se aislaron posteriormente células mononucleares (MNC; del inglés, mononuclear cells) mediante un gradiente de densidades en Biocoll (Biochrom AG, Berlín, Alemania). Las células se cultivaron en placas para cultivo celular revestidas con fibronectina (Greiner, Kremsmünster, Austria) en medio Eagle modificado de Dulbecco con bajo contenido en glucosa (DMEM-LG; PAA, Pasching, Austria) con L-glutamina 2 mM (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EE.UU.) y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina (pen/strep; Lonza, Basilea, Suiza). El medio de cultivo fue complementado con FCS (HyClone, Bonn, Alemania) o HPL, según se indica. El medio de cultivo fue siempre cambiado dos veces a la semana. Una vez alcanzada una confluencia de 80%, las células fueron tratadas con tripsina, contadas en una cámara de recuento Neubauer (Brand, Wertheim, Alemania) y vueltas a sembrar en placas en una cantidad de 10^4 células/cm². Se calcularon las duplicaciones de población acumuladas desde el primer subcultivo en adelante.

Alternativamente, también se pueden aislar MSCs de productos de liposucción.

- Se generó un lisado de plaquetas humanas (HPL) a partir de unidades de plaquetas de donantes sanos, del modo descrito por Horn et al. (2010). En particular, se generó un HPL por aféresis utilizando el sistema de recogida Trima Accel (CaridianBCT, Garching, Alemania). Dichos concentrados de trombocitos tenían un contenido de plaquetas de $2,0$ a $4,2 \times 10^{11}$ plaquetas en 200 ml de plasma complementado con ácido-citrato-dextrosa (ACD) (1:11 en volumen/volumen). Las unidades de plaquetas fueron repartidas en partes alícuotas, congeladas dos veces a -80 °C, descongeladas de nuevo a 37 °C, y centrifugadas a 2600 g durante 30 minutos a 4 °C para separar fragmentos celulares y reunidas en cantidades iguales. El sobrenadante fue filtrado a través de un dispositivo filtrante GD/X de PVDF de $0,22$ µm (Whatman, Dassel, Alemania), opcionalmente complementado con 2 U/ml de heparina para evitar la gelatinización, y almacenado a -80 °C.

- Las células se cultivaron en placas para cultivo celular (Greiner, Kremsmünster, Austria) en medio Eagle modificado de Dulbecco con bajo contenido en glucosa (DMEM-LG; PAA) con L-glutamina 2 mM (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EE.UU.) y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina (pen/strep; Lonza, Basilea, Suiza). El medio de cultivo/sustrato fue complementado con FCS (HyClone, Bonn, Alemania) o HPL, según se indica en la memoria descriptiva. Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía dióxido de carbono al 5%, con cambios de medio dos veces a la semana.

- La proliferación celular se evaluó a través del ensayo del Azul de Tiazolilo, con bromuro de tetrazolio (MTT). Se sembraron MSCs en una placa de 96 pocillos (3000 células/pocillo) en medio de cultivo/sustrato complementado con 0, 1, 5, 10 o 20% de FCS o HPL, según se indica en la memoria descriptiva. Después de 7 días de cultivo, las células fueron lavadas con PBS (PAA) y fueron incubadas con MTT (Sigma-Aldrich) 1 mM en PBS durante 3,5 horas. La disolución en exceso fue desechada y los cristales fueron resueltos en HCl 4 mM en isopropanol (ambos de Roth, Karlsruhe, Alemania). Se midió la densidad óptica (OD; del inglés, optical density) a una longitud de onda de 590 nm con un lector de placas Tecan Infinite 2000 (Tecan Trading, Männedorf, Suiza).

- En la **Figura 1** se muestran disposiciones experimentales para cultivar células, ya sea directamente sobre plásticos para cultivo celular (a) o ya sea sobre un gel de acuerdo con la invención que comprende un lisado de plaquetas humanas (HPL) pero que está desprovisto de heparina (b, c). En el método de la técnica previa de acuerdo con (a), las células 1 son directamente fijadas al plástico 2 para cultivo tisular y son cultivadas en un medio líquido 3 de HPL que contiene heparina. De acuerdo con este conocido método, las células 1 son recolectadas mediante tratamiento enzimático usando tripsina (I). En el método de acuerdo con la invención (b, c), las células son cultivadas sobre, y dentro de, un sustrato 4 de tipo gel que comprende HPL pero está exento de heparina. El medio líquido 3 de cultivo, que cubre el sustrato 4, contiene componentes esencialmente idénticos pero incluye además heparina para inhibir la coagulación. Las células pueden ser recolectadas por degradación del sustrato 4 de tipo gel usando plasmina (II) o por fragmentación del sustrato 4 de tipo gel utilizando una pipeta 5 y volviendo a sembrar posteriormente (III). Como resultado, es posible el subcultivo celular sin necesidad de un tratamiento enzimático. Puesto que el sustrato 4 de tipo gel es biocompatible y proporciona por ello un entorno fisiológico a las células, se minimiza el riesgo de toda influencia indeseada del plástico 2 para cultivo tisular sobre las células. Además, el cubrimiento de la superficie del sustrato 4 de tipo gel con un medio líquido 3 que comprende lisado de plaquetas sanguíneas y una sustancia inhibidora de la gelatinización proporciona ventajosamente un entorno homogéneo a las células y, por lo tanto, asegura unas condiciones de cultivo óptimas.

- En la **Figura 2** se muestra la proliferación de células estromales mesenquimáticas (MSCs) sobre diferentes superficies. Se cultivaron MSCs en un medio de cultivo que comprendía diferentes concentraciones de lisado de plaquetas humanas (HPL) y se determinó el número de células después de siete días utilizando un ensayo MTT. La concentración de HPL dentro del gel era respectivamente consistente con la concentración de HPL en el medio líquido. La proliferación celular en el gel de HPL de acuerdo con la invención (barras negras) resultó

significativamente aumentada si se comparaba con la proliferación sobre plásticos (barras blancas) o gel de colágeno (barras grises). El aumento de proliferación depende directamente de la concentración del medio. En consecuencia, el lisado de plaquetas humanas (HPL) aumenta significativamente la velocidad de proliferación de MSCs procedentes de tejido adiposo. De esta manera, el método de acuerdo con la invención permite una expansión fiable de células y una eficaz minimización de la inhibición por contacto ya que las células pueden crecer tridimensionalmente dentro del sustrato, es decir, en múltiples capas, mientras los factores de crecimiento están uniformemente disponibles en todas las direcciones.

En la **Figura 3** se muestra un diagrama de barras que demuestra la proliferación de células estromales mesenquimáticas (MSCs) mediante diferentes métodos de subcultivo celular con un gel que comprende un lisado de plaquetas humanas (HPL). Se cultivaron MSCs durante siete días sobre geles de HPL y, con fines de comparación, sobre plásticos para cultivo celular. Las células se recolectaron utilizando tratamiento con plasmina o pipeteo, con o sin el subsiguiente tratamiento con tripsina/EDTA o con EDTA, respectivamente, y se transfirieron luego a una nueva placa para cultivo celular que contenía medio sin HPL. Después de un día más de cultivo se determinó el número de células mediante un ensayo MTT. Los valores de proliferación relativos muestran que el subcultivo celular mediante un simple pipeteo sin ningún tratamiento enzimático es un modo ventajoso de separar y volver a sembrar las células ya que se evita el daño celular por digestión enzimática.

En las **Figuras 4 y 5** se muestran diagramas que ilustran la proliferación de células estromales mesenquimáticas (MSCs) procedentes de médula ósea (BM) o tejido adiposo (AT) en función de las concentraciones de heparina (U/ml) y LMWH (Clexane[®], mg/ml), respectivamente. Como resulta evidente de estos diagramas, el número de células aumenta al aumentar la concentración de la sustancia inhibidora de la gelatinización, es decir, heparina o Clexane[®], hasta que se alcanza un valor máximo. Si se aumenta más la concentración de la sustancia inhibidora de la gelatinización dentro del medio líquido, el número de células disminuye hasta que no se puede observar proliferación alguna con concentraciones elevadas de heparina o LMWH. Con heparina, las mejores velocidades de proliferación se pueden alcanzar en el intervalo de 0,1-100 U/ml, preferiblemente de 0,2-50 U/ml, siendo particularmente preferido el intervalo de 0,2-10 U/ml, siendo 0,5-10 U/ml el intervalo más preferido. Con Clexane[®], las mejores velocidades de proliferación se pueden alcanzar en el intervalo de 0,001-1 mg/ml, preferiblemente de 0,005-1 mg/ml, en particular de 0,005-0,5 mg/ml. Con bajas concentraciones de sustancias inhibidoras de la gelatinización se produce gelatinización. Por ejemplo, un medio líquido complementado con HPL al 10% se gelatiniza si sólo se añaden menos de 0,1 U/ml de heparina o menos de 0,001 mg/ml de Clexane[®].

30 Ejemplo

Generación de un lisado de plaquetas humanas

Las unidades de plaquetas fueron amablemente proporcionadas por el Institute for Transfusion Medicine, RWTH Aachen University Medical School, después de su fecha de caducidad (5 días después de la recogida). Las unidades de plaquetas fueron generadas por aféresis utilizando el sistema de recogida Trima Accel (CaridianBCT, Garching, Alemania) y comprenden $2,0-4,2 \times 10^{11}$ plaquetas en 200 ml de plasma complementado con ácido-citrato-dextrosa (ACD) (1:11 en volumen/volumen). Partes alícuotas de 45 ml fueron congeladas dos veces a -80 °C, descongeladas de nuevo a 37 °C y luego centrifugadas a 2600 x g durante 30 minutos. El sobrenadante fue filtrado a través de filtros GD/X de PVDF de 0,2 µm (Whatman, Dassel, Alemania) y fue almacenado a -80 °C hasta su uso. Los experimentos de este estudio se llevaron a cabo con tres colecciones de HPL, cada una de las cuales consistía en lisados de cuatro donantes, pero también se observaron resultados similares utilizando HPLs procedentes de donantes individuales. Los HPLs consistían predominantemente en sangre de tipo A, pero un análisis sistemático no reveló impacto alguno del grupo sanguíneo. Con objeto de evitar la formación de gel de HPL se añadieron 2 U/ml de heparina (Ratiopharm, Ulm, Alemania) como un anticoagulante antes de la adición al medio de cultivo.

Medio de cultivo y gel de HPL

El medio de cultivo consistía en medio Eagle modificado de Dulbecco con bajo contenido en glucosa (DMEM-LG; PAA, Pasching, Austria) con L-glutamina 2 mM (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EE.UU.) y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina (pen/strep; Lonza, Basilea, Suiza) y HPL (10% si no se indica otra cosa). Las células se cultivaron sobre plástico para cultivo tisular (TCP; Greiner, Kremismünster, Austria). Para la preparación del gel, se cargó un medio de cultivo celular que contenía HPL, sin heparina, en placas para cultivo celular. A causa del calcio comprendido en el medio, se inició la cascada de coagulación y se gelatinizó el medio de HPL en una hora a 37 °C. El gel de HPL resultante fue utilizado como un sustrato para cultivo celular que fue sembrado con la misma cantidad de MNCs y fue cubierto con el mismo medio de HPL complementado con heparina. Por comparación, se usaron geles que consistían en colágeno G al 80% (3 mg/ml, colágeno de tipo I/III en HCl 12 mM; Biochrome, Berlín, Alemania) del modo anteriormente descrito. Además, se emplearon geles de fibrina que fueron preparados a partir de polvo de fibrinógeno humano liofilizado (Sigma Aldrich F3789, Deisenhofen, Alemania) disuelto en disolución salina tamponada con Tris (TBS; del inglés, Tris-buffered saline), con adición de CaCl₂ 3,75 mM y 3 UI/ml de polvo de trombina (Sigma Aldrich T1063) disuelto en agua estéril para la reticulación. Las células se cultivaron a 37 °C en placas de 6 pocillos o en frascos T75 para cultivo tisular (Nunc Thermo Fisher Scientific, Langensfeld, Alemania).

Mediciones de elasticidad de los geles de HPL

Para las mediciones de elasticidad se formaron geles de HPL en concentraciones de 5%, 10% y 20% utilizando cilindros de plástico (14 mm de diámetro y 2 mm de altura) como molde sobre la parte superior de cubreobjetos delgados. Después de una gelatinización como la anteriormente descrita, se retiraron los moldes cilíndricos y se cubrieron los geles de HPL con un cubreobjetos de masa conocida. Se determinó el espesor del gel utilizando un microscopio confocal de barrido por láser (LSM 510 Meta, Zeiss, Alemania) provisto de un objetivo Achroplan 40x de gran distancia de trabajo (NA 0.6, PH 2). La colocación de cubreobjetos adicionales de peso conocido y la subsiguiente medición del espesor se repitieron al menos dos veces para cada cilindro de gel de HPL. A partir de las cantidades medidas de espesor de gel (h), masa total de cubreobjetos (m), reducción de espesor debida a la carga (Dh) y sección transversal del gel (A), se calcularon los módulos elásticos del gel de acuerdo con $E = (m \cdot g) / A \cdot (h / \Delta l)$, donde g significa la aceleración debida a la gravitación.

Aislamiento de células estromales mesenquimáticas humanas de médula ósea

Se aislaron MSCs de células mononucleares (MNCs) por adherencia a plástico. En resumen, se lavaron con disolución salina tamponada con fosfato (PBS) fragmentos óseos procedentes de la cabeza del fémur de pacientes sometidos a implantación de una prótesis de cabeza femoral. Posteriormente, se aislaron MNCs mediante centrifugación en un gradiente de densidades de Ficoll (disolución de separación Biocoll, densidad de 1,077 g/l, Biochrom AG, Berlín, Alemania) y se lavaron dos veces con PBS. Luego se resuspendieron al menos 5×10^5 MNCs en medio de cultivo sobre TCP, gel de HPL o geles de colágeno en placas de 6 pocillos. Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5%. El primer cambio de medio se llevó a cabo después de 48 horas para separar células no adherentes. Más tarde se realizaron semicambios de medio dos veces a la semana y se subcultivaron adicionalmente MSCs del modo descrito más adelante.

Aislamiento de fibroblastos dérmicos humanos

Se aislaron fibroblastos de muestras de piel de pacientes sometidos a cirugía estética. Inicialmente, las células se expandieron en DMEM-LG complementado con glutamina (PAA), penicilina/estreptomina (PAA) y FCS al 10% (Biochrom, Berlín, Alemania). Luego se transfirieron células en subcultivo 3 a 5 a unas condiciones de cultivo de HPL como las anteriormente descritas.

Microscopía electrónica de barrido

Se fijaron MSCs humanas/matriz de gel de HPL en glutaraldehído al 3% durante al menos 1 hora a temperatura ambiental, se enjuagaron con PBS y se deshidrataron mediante incubaciones consecutivas en etanol al 30%, 50%, 70%, 90% y 100% durante 10 minutos a temperatura ambiental. Los geles de HPL fueron luego sometidos a secado en el punto crítico en CO₂ líquido y fueron revestidos por pulverización catódica con una capa de oro de 30 nm usando un dispositivo de revestimiento por pulverización catódica con iones (LEICA EM SCD 500). Se analizaron muestras usando un microscopio electrónico ambiental de barrido en la instalación de microscopios electrónicos, RWTH Aachen University (ESEM XL 30 FEG, FEI, Philips, Eindhoven, Holanda).

Tinción de cortes histológicos-HE

Para el análisis histológico, se fijaron en formaldehído al 3,7%, durante 24 horas, geles de HPL con células cultivadas en la superficie. Las construcciones fueron embebidas en parafina, orientadas sobre el plano perpendicular, cortadas con un espesor de 2 µm mediante un microtomo giratorio (Leica, Wetzlar, Alemania) y teñidas con hematoxilina y eosina de acuerdo con protocolos de histología rutinarios.

Ensayo de proliferación y análisis de vitalidad

Se evaluó la proliferación celular por medio del ensayo del metil-tiazolil-tetrazolio (MTT). En resumen, se sembraron MSCs de subcultivo 3-6 en placas de 96 pocillos (3000 células/cm²) sobre TCP, gel de colágeno, gel de fibrina o geles de HPL en medio de cultivo complementado con HPL al 1%, 5%, 10% o 20%. Después de 7 días, las células se lavaron con PBS y se incubaron con MTT 1 mM (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EE.UU.) durante 3,5 horas a 37 °C. La disolución en exceso fue desechada y los cristales de formazán fueron resueltos en HCl 4 mM en isopropanol (ambos de Roth, Karlsruhe, Alemania). Se midió la absorbancia a 590 nm usando un lector de placas Tecan Infinite 200 (Tecan Trading, Suiza). Cada medición incluía cuatro repeticiones técnicas. Alternativamente, se estimó la proliferación mediante tinción con éster N-succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) del modo anteriormente descrito. Además, se llevó a cabo una tinción nuclear o una tinción de células vivas-muertas con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol; Molecular Probes) o con 5 µg/ml de diacetato de fluoresceína (Sigma) y 0,5 µg/ml de yoduro de propidio (BD Pharmingen), respectivamente, después de 7 días de cultivo sobre TCP o geles de HPL, realizándose el análisis con un microscopio de fluorescencia Leica DM IL HC.

Ensayo de unidades formadoras de colonias fibroblastoides (CFU-f)

El ensayo de CFU-f se llevó a cabo sembrando MNCs, en una serie de dilución limitante en placas de 96 pocillos (330.000, 100.000, 33.000, 10.000, 3000 y 1000 células por pocillo; al menos 24 pocillos por paso de dilución en cada experimento), al mismo tiempo sobre TCP y sobre gel de HPL. El medio se cambió después de 48 horas por vez primera y luego dos veces a la semana. Después de 14 días en cultivo, las células fueron lavadas dos veces con

PBS y fueron marcadas con MTT. Todos los pocillos con crecimiento celular fueron calificados positivos, y se determinó la frecuencia de CFU-f mediante una distribución de Poisson (L-calc; Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá).

Subcultivo y cultivo de larga duración de MSCs

5 Se subcultivaron continuamente MSCs sobre TCP después de alcanzar un nivel de confluencia de 80% utilizando una disolución de tripsina-EDTA de 0,25% (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EE.UU.). Las células sobre gel de HPL fueron recolectadas junto con el gel mediante pipeteo. De este modo, la mezcla de gel-MSc fue diluida con medio de cultivo y fue luego sembrada sobre placas con pocillos revestidos con gel de HPL fresco. Para determinar el número de células MSC, se sembró una fracción de la mezcla de MSC/gel de HPL sobre TCP durante 24 horas para facilitar la fijación a la superficie del plástico. Luego se trataron con tripsina las células adherentes a plástico y se determinó finalmente el número de células utilizando una cámara de recuento Neubauer (Brand, Wertheim, Alemania). Las duplicaciones de población celular por subcultivo (PDP; del inglés, *population doublings per passage*) y las duplicaciones de población acumuladas (cPD) se calcularon del modo conocido en la técnica. Alternativamente, se incubaron MSCs/gel de HPL con 20 µg de plasmina (disolución madre de 2,76 mg/ml; Enzyme Research Laboratories, Indiana, EE.UU.) durante 18 horas a 37 °C.

Para comparar los diferentes métodos de propagación celular, se sembraron MSCs al mismo tiempo sobre TCP y sobre gel de HPL (1000 células/pocillo) y se dejaron adherir durante la noche. Las células sobre TCP fueron luego subcultivadas con tripsina, mientras que las MSCs sobre gel de HPL fueron recolectadas mediante pipeteo con o sin incubación adicional con tripsina/EDTA durante 5 minutos, o con plasmina del modo anteriormente descrito. Se volvieron a sembrar todas las células sobre TCP y, después de 1 día, se estimaron los números de células adherentes y no adherentes utilizando el ensayo MTT.

Análisis inmunofenotípico

Para la caracterización de MSCs hemos empleado un conjunto de marcadores superficiales. Se aislaron MSCs y se cultivaron durante tres subcultivos sobre TCP o sobre gel de HPL. Para eliminar el gel de HPL antes del análisis citométrico de flujo, hemos sembrado las células para un subcultivo adicional sobre TCP o hemos recolectado el gel de HPL por pipeteo y lavado las células una vez en medio de cultivo. Cada preparación celular fue teñida en paralelo con los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-CD14 humano de ratón-APC (clon M5E2), CD29-PE (clon MAR4), CD31-PE (clon WM59), CD34-APC (clon 8G12), CD45-APC (clon HI30), CD73-PE (clon AD2), CD90-APC (clon 5E10) (todos de BD Bioscience, Heidelberg, Alemania) y CD105-FITC (clon MAR226; ImmunoTools, Friesoythe, Alemania). El análisis se llevó a cabo usando un citómetro FACS Canto II (BD Bioscience, Heidelberg, Alemania), y los datos recogidos se analizaron con el software WinMDI 2.9 (Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry). Para la comparación estadística de las diferentes medidas hemos normalizado las intensidades de fluorescencia con respecto a las correspondientes medidas de autofluorescencia.

Diferenciación *in vitro*

35 Se sembraron directamente MSCs recién aislados sobre geles de HPL o TCP y se expandieron durante tres subcultivos antes de la diferenciación *in vitro*. Luego se indujo la diferenciación hacia los linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico del modo conocido en la técnica. Esta diferenciación de gel de HPL-MSc se llevó a cabo sobre gel de HPL o tras transferencia a TCP. La diferenciación condrogénica se llevó a cabo en cultivo 3D de sedimento tras centrifugación a 400 x g durante 7 minutos. Después de tres semanas, se analizó la diferenciación mediante tinción con Rojo de Alizarina (diferenciación osteogénica), con el colorante fluorescente verde BODIPY (4,4-difluoro-1,2,5,7,8-pentametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno; Molecular Probes, Eugene, EE.UU.; diferenciación adipogénica) o con Azul Alcian y Rojo Nuclear Rápido (para cortes de muestras condrogénicas diferenciadas) de acuerdo con protocolos rutinarios de histología, realizándose el análisis con un microscopio de fluorescencia Leica DM IL HC (Leica, Wetzlar, Alemania). Además, se cuantificó la diferenciación adipogénica sobre TCP y gel de HPL mediante contratinción de todas las células con DAPI y recuento directo de células no diferenciadas en relación con células diferenciadas (al menos 300 células por experimento).

Estadística

Los resultados se expresan como valor medio ± desviación estándar de experimentos independientes. Para estimar la probabilidad de diferencias, hemos seguido la prueba T de Student para muestras apareadas y dos colas.

50 Resultados

Se formaron geles translúcidos en un periodo de 30 a 60 minutos tras la adición de HPL a medio de cultivo en ausencia de anticoagulantes. Los geles de HPL resultantes tenían una consistencia muy blanda y viscosa. La elasticidad del sustrato era sumamente baja y aumentaba con los mayores porcentajes de HPL (5% de HPL: 20 Pa; 10% de HPL: 28 Pa; 20% de HPL: 32 Pa; **Figura 6A**). Se cubrieron estos geles con el mismo medio de HPL complementado con heparina para evitar la gelatinización de la fase líquida. Cuando se sembraron MSCs sobre gel de HPL, crecieron en la interfase entre el gel de HPL y el medio de HPL sin contacto alguno con la superficie del plástico. La tinción para células vivas/muertas apenas reveló alguna célula no vital después de siete días de cultivo.

El análisis histológico demostró un crecimiento en múltiples capas en esta interfase entre el gel y el medio. Las densidades celulares eran mucho mayores en el gel de HPL en comparación con el crecimiento bidimensional sobre el plástico para cultivo tisular (TCP; **Figura 6B**). La microscopía electrónica de barrido demostró el andamio de fibrina del gel de HPL y sustentó la idea de que las MSCs cubrían densamente esta matriz en forma de múltiples capas (**Figuras 6C-E**). Las MSCs pueden secretar enzimas que degradan la fibrina y, por lo tanto, evaluamos el mantenimiento de un gel de HPL delgado tras la expansión del cultivo: en los primeros 4 días apenas se observó degradación alguna, mientras que, después de 8 días, algunos geles de HPL estaban parcialmente degradados y las células entraban en contacto con la superficie del plástico. Esto se observó particularmente en pocillos de cultivo más grandes, mientras que apenas se producía degradación en placas para multititulación.

5 Se analizó la proliferación sembrando MSCs adherentes a plástico al mismo tiempo sobre TCP, andamios de colágeno, gel de fibrina y gel de HPL. Se complementó el medio de cultivo con diferentes concentraciones de HPL (1%, 5%, 10% y 20%) y se ajustaron correspondientemente las concentraciones de HPL en el gel y el medio (n = 7). Después de siete días, el ensayo MTT reveló que la proliferación de MSCs aumentaba al aumentar la concentración de HPL, lo que está de acuerdo con observaciones previas. Resultó notable que la expansión celular fuera significativamente mayor sobre HPL gel que sobre TCP, gel de colágeno (**Figura 7A**) o gel de fibrina (**Figura 7B**). Se observaron resultados similares con fibroblastos dérmicos (**Figura 7C**). Además, examinamos la proliferación en el curso de la expansión del cultivo después de 2, 5, 7 y 9 días. La ventaja proliferativa sobre gel de HPL se hizo más y más evidente, especialmente después de 9 días, cuando las MSCs ya eran confluentes sobre TCP (**Figura 7D**). Es necesario tener en cuenta que el ensayo MTT es sólo un indicador indirecto del número de células al medir la actividad metabólica. Sin embargo, también se observó la misma tendencia cuando se midió la fluorescencia residual tras tinción con CFSE o recuento de núcleos teñidos con DAPI. De este modo, la proliferación resultaba muy aumentada sobre gel de HPL. Comparamos posteriormente el brote inicial de MSCs sembrando células mononucleares de médula ósea humana al mismo tiempo sobre TCP y gel de HPL para determinar el número de unidades formadoras de colonias fibroblastoides (CFU-f). Este análisis se llevó a cabo mediante ensayos de dilución limitante en un formato de múltiples pocillos para excluir efectos por proliferación o actividad migratoria. La frecuencia media de CFU-f sobre TCP fue 88,35 por 10⁶ MNCs. Resulta interesante que la frecuencia de CFU-f sea 2,24 veces mayor sobre gel de HPL que sobre TCP (P = 0,02, n = 3; **Figura 7E**). Estos resultados indican que el gel de HPL potencia el brote de MSCs.

El cultivo de larga duración y la expansión a gran escala de células requieren sucesivas operaciones de subcultivo. Esto se lleva normalmente a cabo recolectando las células con tripsina/EDTA en el momento en que las células alcanzan cierto nivel de confluencia. El gel de HPL es demasiado frágil para tales procedimientos de recolección desde la superficie del gel. En vez de ello, la matriz de fibrina del gel de HPL fue degradada mediante la adición de plasmina a la fase líquida durante la noche, por medio de lo cual se disolvió el andamio de fibrina del gel de HPL y se reubicaron las células sobre el TCP, lo que facilitó luego los procedimientos de subcultivo convencionales. Sin embargo, la consistencia semifluida del gel de HPL permitió un modo más conveniente para el subcultivo sin contacto intermedio de las células con la superficie del plástico: el gel de HPL viscoso fue pipeteado junto con las células y fue vuelto a sembrar sin separación de las MSCs de su matriz (**Figura 8A**). Este método se empleó a lo largo de cuatro subcultivos subsiguientes, y los índices de expansión fueron similares a los del método convencional sobre TCP con tripsina (**Figura 8B**). Para evaluar el índice de recuperación celular después del subcultivo determinamos cuántas células permanecían asociadas con tapones no disueltos de gel de HPL usando el ensayo MTT: aproximadamente 1/3 de las células permanecían separadas con el procedimiento del pipeteo, mientras que la mayoría de las células eran capaces de brote adherente a plástico. El porcentaje de células en crecimiento resultó ligeramente aumentado mediante el tratamiento adicional con tripsina, la cual podría alterar la adhesión célula-célula sobre el gel de HPL. Resultó notable que la actividad celular fuera menor tras el tratamiento con plasmina, lo que podría ser debido al hecho de que el tratamiento de larga duración con esta peptidasa es perjudicial para la supervivencia de las MSCs (**Figura 8C**).

Las condiciones de cultivo pueden afectar a la composición de las subpoblaciones y ejercen un impacto directo sobre las características celulares. Por lo tanto, para la comparación morfológica de preparaciones de MSCs aisladas en cultivo sobre TCP o sobre gel de HPL, hemos transferido ambas para un subcultivo en las mismas condiciones de TCP convencionales; no se observaron diferencias en el crecimiento adherente a plástico ni en la morfología celular. El análisis inmunofenotípico de MSCs sobre gel de HPL se llevó a cabo, bien con células que fueron directamente recolectadas de gel de HPL o bien tras transferir las células a TCP para un subcultivo adicional. Todas las preparaciones de MSCs (sobre TCP, gel de HPL, o gel de HPL con transferencia a TCP) revelaron el mismo inmunofenotipo CD14⁺, CD31⁻, CD34⁻, CD45⁻, CD29⁺, CD73⁺, CD90⁺ y CD105⁺ sin diferencias significativas (n = 4; **Figura 9A**). La diferenciación *in vitro* hacia linajes adipogénicos y osteogénicos fue inicialmente comparada sobre TCP para excluir posibles efectos de los diferentes sustratos; no se observaron diferencias entre las MSCs que fueron aisladas sobre TCP y aquellas sobre gel de HPL con transferencia a TCP para un subcultivo (n > 3; **Figuras 9B-C**). Además, se indujo directamente diferenciación adipogénica sobre gel de HPL y no hubo diferencia significativa alguna en el porcentaje de células con gotitas lipídicas sobre TCP y gel de HPL (42% frente a 37%, n = 3). También se indujo diferenciación osteogénica directamente sobre gel de HPL sin diferencias aparentes entre TCP y gel de HPL (n = 3). Se indujo diferenciación condrogénica en cultivo de sedimento tras recoger directamente las células de TCP o de gel de HPL; un análisis del depósito de proteoglicanos con Azul Alcian no reveló diferencias significativas (**Figura 9D**). Estos resultados demuestran que los procedimientos de cultivo modificados sobre gel de

HPL facilitan el aislamiento de células con características de MSC típicas.

El gel de lisado de plaquetas humanas proporciona una nueva matriz para la expansión de MSCs en cultivo. El principal componente del gel es un andamio de fibrina que normalmente se polimeriza en un coágulo en forma de red durante las fases finales de la cascada homeostática de coagulación. El fibrinógeno procede de la fracción plasmática de las unidades de plaquetas, y la cascada de coagulación resulta inhibida por la quelación de los iones de calcio con citrato. Tras la adición al medio de cultivo DMEM, el exceso de iones de calcio estimula la polimerización hasta una matriz de fibrina. Esta matriz presenta muchas ventajas: (i) aparece de forma natural, especialmente en zonas de formación y regeneración de heridas; (ii) es biocompatible y biodegradable; (iii) es traslúcida, lo que facilita las observaciones microscópicas; y (iv) hay un creciente interés en los andamios de fibrina para aplicaciones de ingeniería tisular. Además, se puede inyectar gel de HPL en combinación con células embebidas en escenarios de trasplante, lo que podría facilitar mayores recuperación y supervivencia de células que la inyección de sedimentos celulares en disoluciones acuosas.

Una expansión eficaz y unas elevadas velocidades de proliferación son importantes para muchas aplicaciones celulares. Hemos demostrado que la proliferación era mayor sobre gel de HPL en comparación con el cultivo sobre TCP, gel de fibrina o gel de colágeno. Se ha demostrado que el HPL es un complemento sérico muy eficaz que potencia además la proliferación de MSCs en comparación con el FCS. La fracción de plaquetas comprende factores de crecimiento relevantes, tales como factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGFs; del inglés, *platelet derived growth factors*), que sustentan esta tremenda estimulación del crecimiento en comparación con el plasma o el suero humanos. La proliferación aumentada sobre gel de HPL podría ser debida a las razones siguientes: 1) en gel de HPL los nutrientes y factores de crecimiento son accesibles a las células desde todas las direcciones y su suministro es tamponado por la matriz subyacente; 2) el crecimiento celular no está estrictamente limitado a dos dimensiones con inhibición por contacto tras crecimiento confluyente. En vez de ello, las células proliferan más homogéneamente y alcanzan mayores densidades celulares sobre gel de HPL; y 3) el gel de HPL podría facilitar una mejor interacción adhesiva con proteínas de adhesión específicas tales como las integrinas. Esto podría contribuir además al brote significativamente potenciado de CFU-f sobre gel de HPL. En conjunto, el gel de HPL potencia acusadamente la expansión de MSCs por una mejor recuperación de colonias iniciales, mayores velocidades de proliferación y mayores densidades celulares en múltiples capas.

La propagación de células a lo largo de los subcultivos subsiguientes implica normalmente un tratamiento enzimático, por ejemplo, con tripsina o Accutase™, con objeto de recolectar las células de la superficie del cultivo celular; después de operaciones de lavado la suspensión de células es sembrada sobre nuevas placas de cultivo. Este procedimiento ejerce poco impacto sobre la supervivencia de las células pero detiene a éstas en su ciclo proliferativo. Otra alternativa para la recolección celular exenta de enzimas es el uso de polímeros termosensibles que puedan liberar células después de un cambio de temperatura. Si se requiere, el gel de HPL puede ser disuelto por plasmina, que es una peptidasa fisiológica, aunque se ha mostrado que la plasmina exógena afecta a la supervivencia de las MSCs a lo largo del tiempo. Resulta más importante que la naturaleza muy blanda y viscosa del gel de HPL facilite un procedimiento alternativo por pipeteo de las células junto con su matriz sobre nuevas placas de cultivo. Esto sólo fue posible a causa de la naturaleza sumamente blanda del gel de HPL; los geles de colágeno y de fibrina convencionales son más rígidos. Inicialmente, esperábamos que la recuperación celular pudiera resultar impedida ya que las células pueden quedar atrapadas en fragmentos de gel de HPL o podrían resultar alteradas durante el procedimiento de pipeteo. A pesar de cierta pérdida de células en los fragmentos de gel de HPL, los índices de expansión estaban en un intervalo similar a aquél con los métodos convencionales usando tripsina sobre TCP, probablemente a causa de la velocidad de proliferación en gran medida aumentada. El procedimiento de subcultivo sin separar las células de su matriz presenta varias ventajas ya que no se requieren operaciones de lavado ni centrifugación. Esto es de interés específico para protocolos mejorados para automatización del cultivo de células. Los planteamientos de automatización pueden ayudar a satisfacer las crecientes y costosas necesidades en terapia celular en el futuro, y un simple procedimiento de pipeteo es mucho más sencillo de implementar sobre dichas plataformas.

No es una tarea trivial determinar los números de células exactos sobre gel de HPL. Para la mayoría de los experimentos usamos el ensayo MTT, que no requiere separación de células de la matriz de gel. Sin embargo, este ensayo sólo proporciona una estimación indirecta de números de células al medir la conversión de MTT en formazán. Alternativamente, contamos núcleos teñidos con DAPI, pero la cuantificación fiable resultó afectada por la localización de células en diferentes niveles del gel de HPL. Se puede emplear plasmina para degradar los geles de HPL, pero esto puede comprometer la viabilidad celular a lo largo del tiempo, y, por consecuencia, la señal del MTT fue menor después del tratamiento con plasmina. Alternativamente, diluimos el gel de HPL con medio de cultivo para transferir estas células a superficies de TCP convencionales. Como se describió anteriormente, este procedimiento de subcultivo funcionó eficazmente y se pudo transferir la mayoría de las MSCs a la superficie del TCP, potencialmente por migración o aclaramiento del gel de HPL con el procedimiento de pipeteo. Sin embargo, aproximadamente 1/3 de las células siguieron no adherentes en fragmentos de HPL flotantes. Esta pérdida celular pudo ser ligera pero no significativamente reducida mediante un tratamiento adicional con tripsina/EDTA, posiblemente a causa de una alteración de la adhesión célula-célula entre las MSCs sobre el gel de HPL. Otro aspecto importante es la estabilidad del gel de HPL, que puede ser parcialmente degradado por enzimas fibrinolíticas secretadas por MSCs. Por otro lado, nuestro estudio demostró que es posible utilizar gel de HPL incluso

para un cultivo de larga duración a lo largo de 3 semanas sin adición de agentes antifibrinolíticos, aunque se podría potenciar la estabilidad mediante aprotinina o ácido tranexámico.

La estandarización de protocolos es un asunto importante en la generación de productos celulares terapéuticos. Suplementos séricos tales como FCS y HPL revelan notoriamente variaciones de lote a lote. En nuestro trabajo previo demostramos diferencias en los HPLs generados a partir de unidades de plaquetas individuales, y el efecto estimulante declinó significativamente con la edad del donante de HPL. Se ha de advertir que observamos también cierta variación en el proceso de gelatinización que podría resultar de la fracción plasmática del HPL. Una ulterior investigación permitirá un mejor control de la formación de gel y la estandarización de geles de HPL y proporcionará una mejor comprensión de la variación asociada con el donante de HPL. Esta variación puede ser nivelada mediante la reunión de varios HPLs, mientras que puede resultar favorable utilizar un gel de HPL procedente de un solo donante –incluso posiblemente del receptor del trasplante– para reducir el riesgo de infecciones por agentes patógenos humanos.

El crecimiento celular y la diferenciación *in vitro* pueden resultar influidos por la elasticidad de la superficie. El gel de HPL reveló una elasticidad de sustrato de aproximadamente 30 Pa; esta elasticidad es muy baja y está incluso por debajo de la rigidez estimada del tejido adiposo. Se podría esperar que la diferenciación adipogénica fuera más acusada sobre gel de HPL que sobre TCP, pero este efecto no se hizo evidente en nuestro análisis. En general, no detectamos efectos evidentes sobre la morfología, el inmunofenotipo ni el potencial de diferenciación, lo que indica que la composición de las MSCs podría ser similar sobre gel de HPL y sobre TCP. En cualquier caso, el gel de HPL facilita el aislamiento de células con características de MSC típicas.

En conclusión, el gel de HPL es una matriz sumamente blanda que proporciona nuevas perspectivas diferentes para el cultivo celular. Facilita el crecimiento celular embebido en componentes de medio de cultivo sin ningún contacto con biomateriales artificiales tales como poliestireno. Además, este medio no incluye componentes xenogénicos tales como FCS. Incluso es concebible emplear gel de HPL en un escenario autólogo para minimizar más el riesgo de efectos inmunológicos o infecciones. El brote inicial y la velocidad de proliferación de las MSCs fueron mucho mayores sobre gel de HPL que sobre TCP. La consistencia mecánica permite un simple procedimiento de subcultivo sin necesidad de separar las células de su matriz ni operaciones de lavado adicionales; este conveniente procedimiento de propagación es de relevancia específica para la automatización del cultivo celular. El gel de HPL puede facilitar una generación más rápida de altos números de células en terapia celular.

El cultivo de células en medicina regenerativa necesita facilitar una expansión eficaz de acuerdo con los requisitos de GMP. El lisado de plaquetas humanas (HPL) puede ser empleado como sustituto del suero de ternera fetal (FCS) sin riesgo de reacciones inmunes xenogénicas ni transmisión de agentes patógenos bovinos. Es necesario añadir heparina como anticoagulante antes de la adición de HPL al medio de cultivo; de lo contrario, el medio de HPL forma un gel en un plazo de una hora. Demostramos aquí que dichos geles de HPL proporcionan una matriz tridimensional adecuada para cultivo celular que –aparte de la heparina– consiste en los mismos componentes que los del medio de cultivo dispuesto encima. Las células estromales mesenquimáticas (MSCs) crecieron en varias capas en la interfase entre el gel de HPL y el medio de HPL sin contacto con ningún biomaterial artificial. Resultó notable que la proliferación de MSCs fuera mucho mayor sobre gel de HPL que sobre plástico para cultivo tisular (TCP). Además, la frecuencia de unidades formadoras de colonias fibroblastoides (CFU-f) iniciales resultó aumentada sobre gel de HPL. La consistencia viscosa del gel de HPL permitió el subcultivo con un conveniente procedimiento de recolección y resiembra por pipeteo de las células junto con su matriz de HPL; este método no requiere operaciones de lavado y puede ser fácilmente automatizado. El inmunofenotipo y la potencial diferenciación *in vitro* hacia linajes adipogénico, osteogénico y condrogénico no resultaron afectados por el cultivo-aislamiento sobre gel de HPL. En conjunto, el gel de HPL presenta muchas ventajas con respecto a las superficies de plástico convencionales: facilita el brote potenciado de CFU-f, velocidades de proliferación aumentadas, mayores densidades celulares y procedimientos de subcultivo no enzimáticos para la expansión de MSCs en cultivo.

Bibliografía de no patentes

Blande, I. S.; Bassaneze, V.; Lavini-Ramos, C.; Fae, K. C.; Kalil, J.; Miyakawa, A. A.; Schettert, I. T.; Krieger, J. E.: Adipose tissue mesenchymal stem cell expansion in animal serum-free medium supplemented with autologous human platelet lysate. *Transfusion* 49: 2680-2685; 2009.

Heiskanen, A.; Satomaa, T.; Tiitinen, S.; Laitinen, A.; Mannelin, S.; Impola, U.; Mikkola, M.; Olsson, C.; Miller-Podraza, H.; Blomqvist, M.; Olonen, A.; Salo, H.; Lehenkari, P.; Tuuri, T.; Otonkoski, T.; Natunen, J.; Saarinen, J.; Laine, J.: N-glycolylneuraminic acid xenoantigen contamination of human embryonic and mesenchymal stem cells is substantially reversible. *Stem Cells* 25:197-202; 2007.

Horn, P.; Bokermann, G.; Cholewa, D.; Bork, S.; Walenda, T.; Koch, C.; Drescher, W.; Hutschenreuther, G.; Zenke, M.; Ho, A.; Wagner, W.: Comparison of Individual Platelet Lysates for Isolation of Human Mesenchymal Stromal Cells. *Cytotherapy* 12: 888-898; 2010.

Sundin, M.; Ringden, O.; Sundberg, B.; Nava, S.; Gothstrom, C.; Le Blanc K.: No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic

hematopoietic stem cell recipients. *Haematologica* 92:1208-1215; 2007.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para cultivar células adherentes empleando un medio líquido que comprende un lisado de plaquetas sanguíneas y una sustancia inhibidora de la gelatinización, método que comprende cultivar las células sobre la superficie de, y/o dentro de, un sustrato tridimensional de tipo gel que comprende 1-40% de lisado de plaquetas sanguíneas pero que está sustancialmente desprovisto de una sustancia inhibidora de la gelatinización, en donde el medio líquido se dispone como una capa sobre el sustrato de tipo gel.
2. Un método según la Reivindicación 1, en donde el medio líquido y el sustrato de tipo gel, junto con la sustancia inhibidora de la gelatinización, tienen composiciones sustancialmente idénticas.
- 10 3. Un método según la Reivindicación 1 o 2, en donde el subcultivo o la recolección de las células se lleva a cabo por degradación enzimática del sustrato de tipo gel, preferiblemente utilizando una peptidasa, en particular plasmina.
4. Un método según la Reivindicación 1, 2 o 3, en donde el subcultivo o la recolección de las células se lleva a cabo mediante una fragmentación mecánica de la estructura de tipo gel, preferiblemente por pipeteo.
- 15 5. Un método según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4, en donde la sustancia inhibidora de la gelatinización comprende heparina o una heparina de bajo peso molecular (LMWH).
6. Un método según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5, en donde el medio líquido comprende 0,1-100 U/ml de heparina o 0,001-1 mg/ml de LMWH como sustancia inhibidora de la gelatinización.
7. Un método según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6, en donde tanto el medio líquido como el sustrato de tipo gel están sustancialmente desprovistos de suero.
- 20 8. Un método según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 7, en donde dichas células son células madre o progenitoras, preferiblemente células madre mesenquimáticas, en particular células estromales mesenquimáticas.
9. Un método según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 8, en donde dichas células son células mesodérmicas, preferiblemente fibroblastos o células estromales mesenquimáticas.
- 25 10. Un método para producir un sustrato tridimensional de tipo gel, método que comprende:
 - proporcionar un concentrado de trombocitos;
 - recolectar plaquetas sanguíneas de dicho concentrado;
 - lisar las plaquetas sanguíneas;
 - 30 – añadir al menos un componente de medio al lisado con objeto de obtener un medio que comprenda 1-40% de lisado de plaquetas sanguíneas; y
 - dejar que el medio de lisado de plaquetas sanguíneas se gelatinice a aproximadamente 37 °C con objeto de obtener un sustrato de tipo gel que comprenda un lisado de plaquetas sanguíneas.
11. Un método según la Reivindicación 10, en donde dicho componente de medio comprende una composición de medio normalizada para cultivo celular, preferiblemente medio DMEM.
- 35 12. Un método según la Reivindicación 10 u 11, en donde dicho sustrato comprende 5-40% de lisado de plaquetas sanguíneas, más preferiblemente 5-20% de lisado de plaquetas sanguíneas, en particular aproximadamente 10-20% de lisado de plaquetas sanguíneas.
13. Un sistema de dos fases que comprende (a) un medio líquido que comprende un lisado de plaquetas sanguíneas y una sustancia inhibidora de la gelatinización, y (b) un sustrato tridimensional de tipo gel que comprende 1-40% de lisado de plaquetas sanguíneas pero que está sustancialmente desprovisto de una sustancia inhibidora de la gelatinización.
- 40 14. El sistema de dos fases según la Reivindicación 13, en donde el medio líquido y el sustrato de tipo gel, junto con la sustancia inhibidora de la gelatinización, tienen composiciones sustancialmente idénticas.

FIG. 1

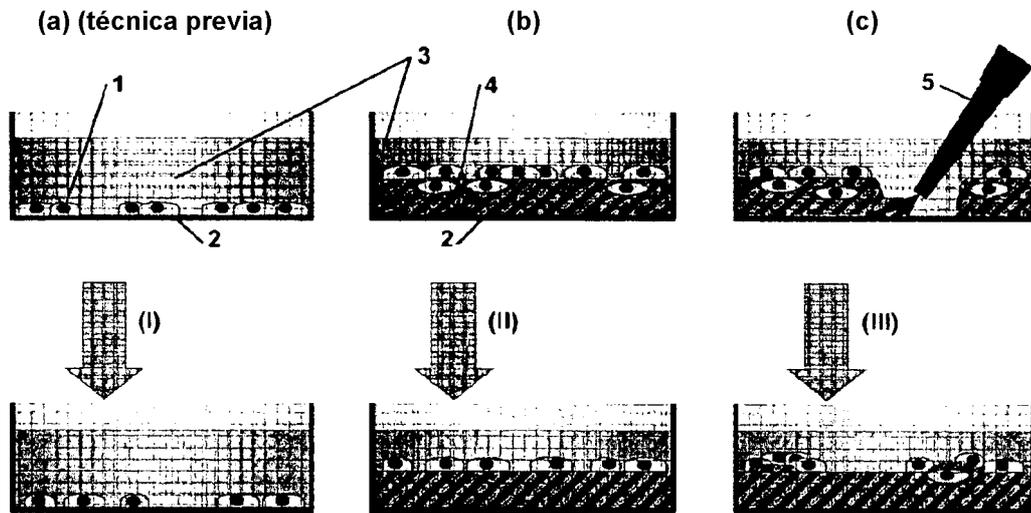


FIG. 2

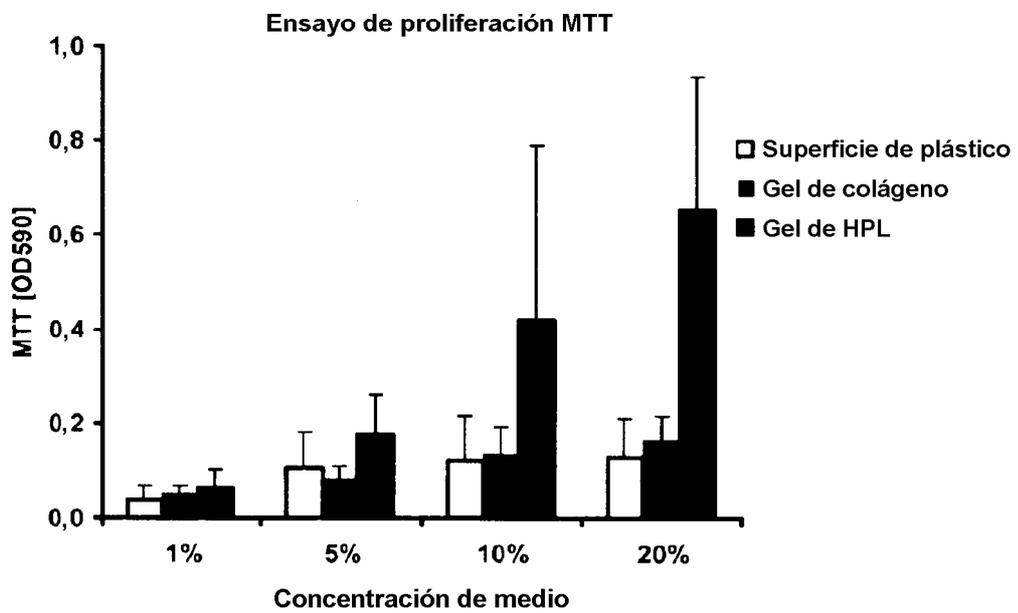


FIG. 3

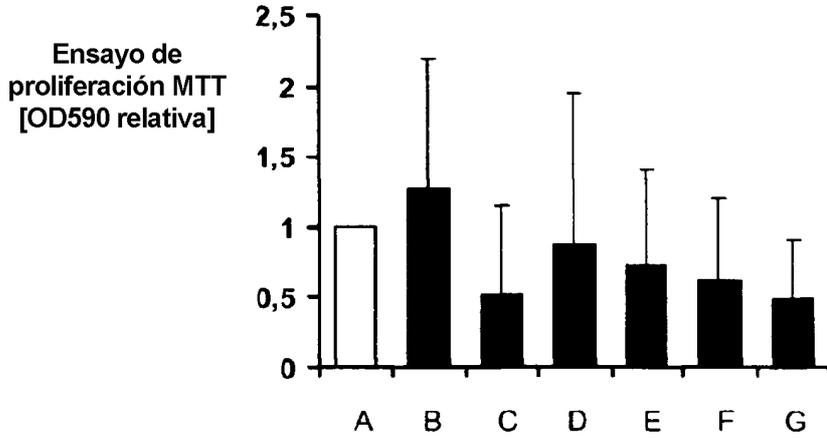


FIG. 4

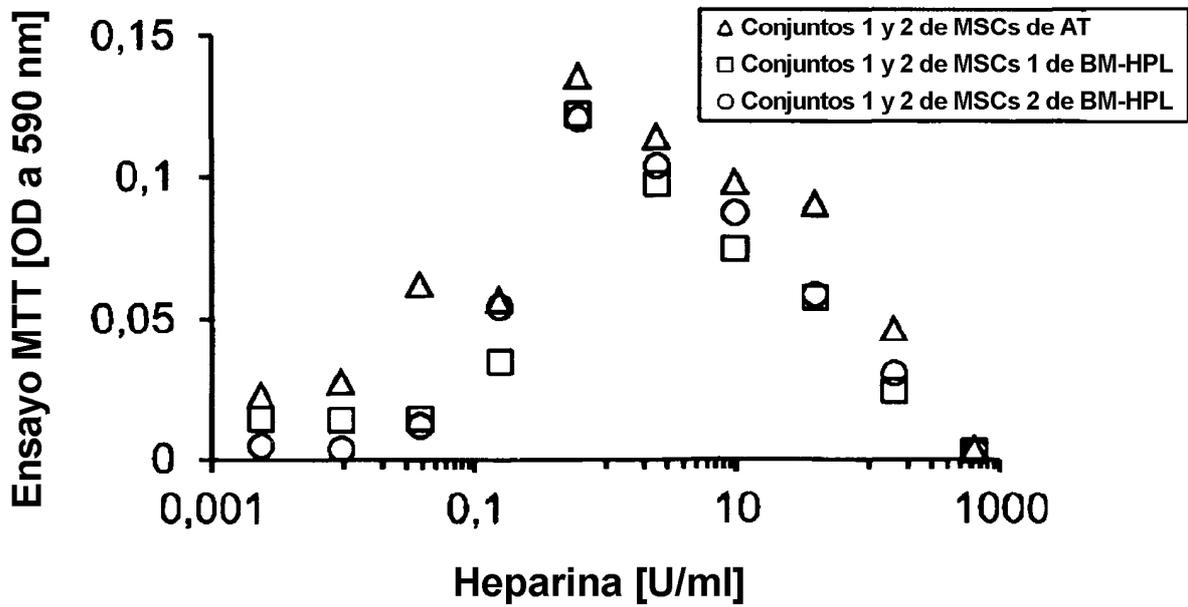


FIG. 5

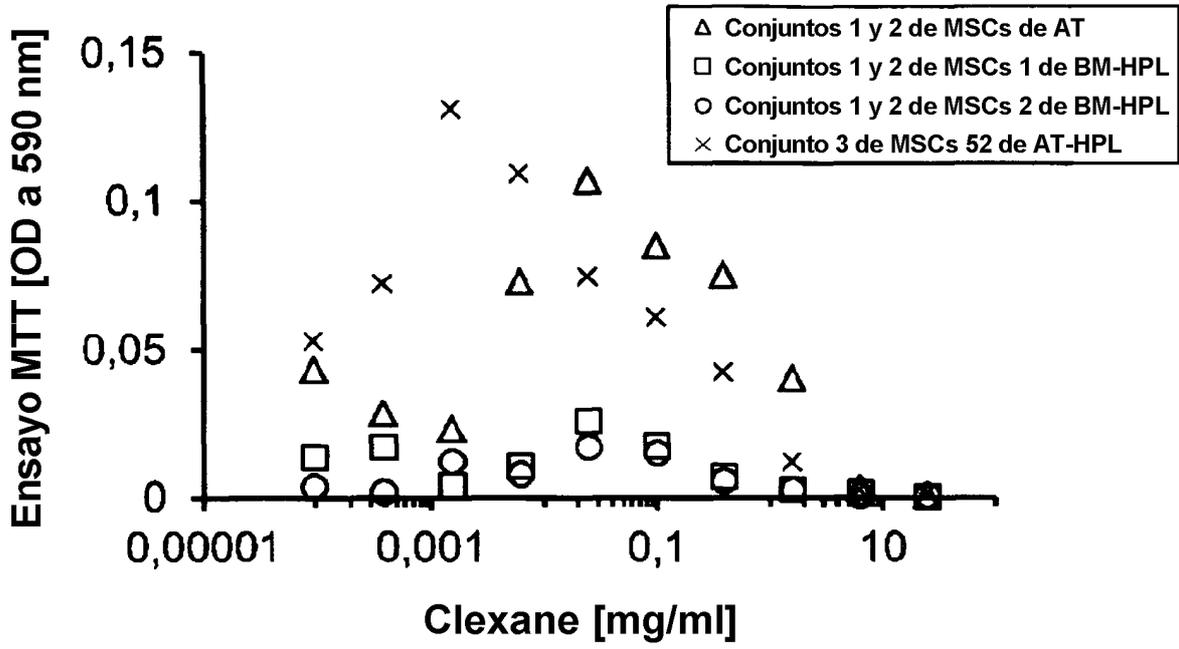
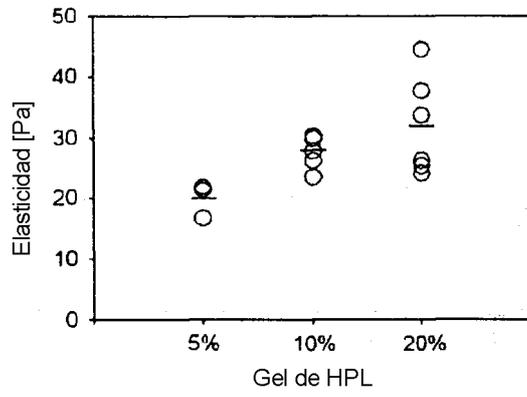


FIG. 6

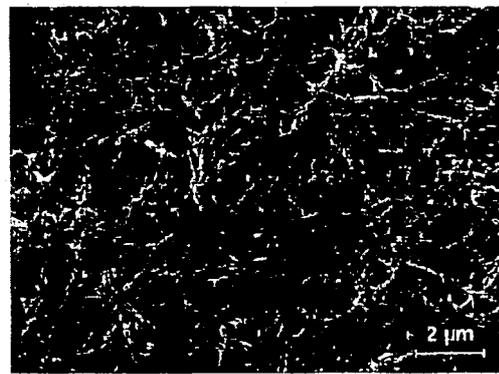
A



B



C



D



E

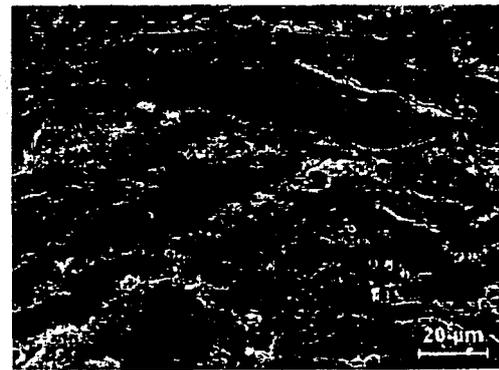


FIG. 7

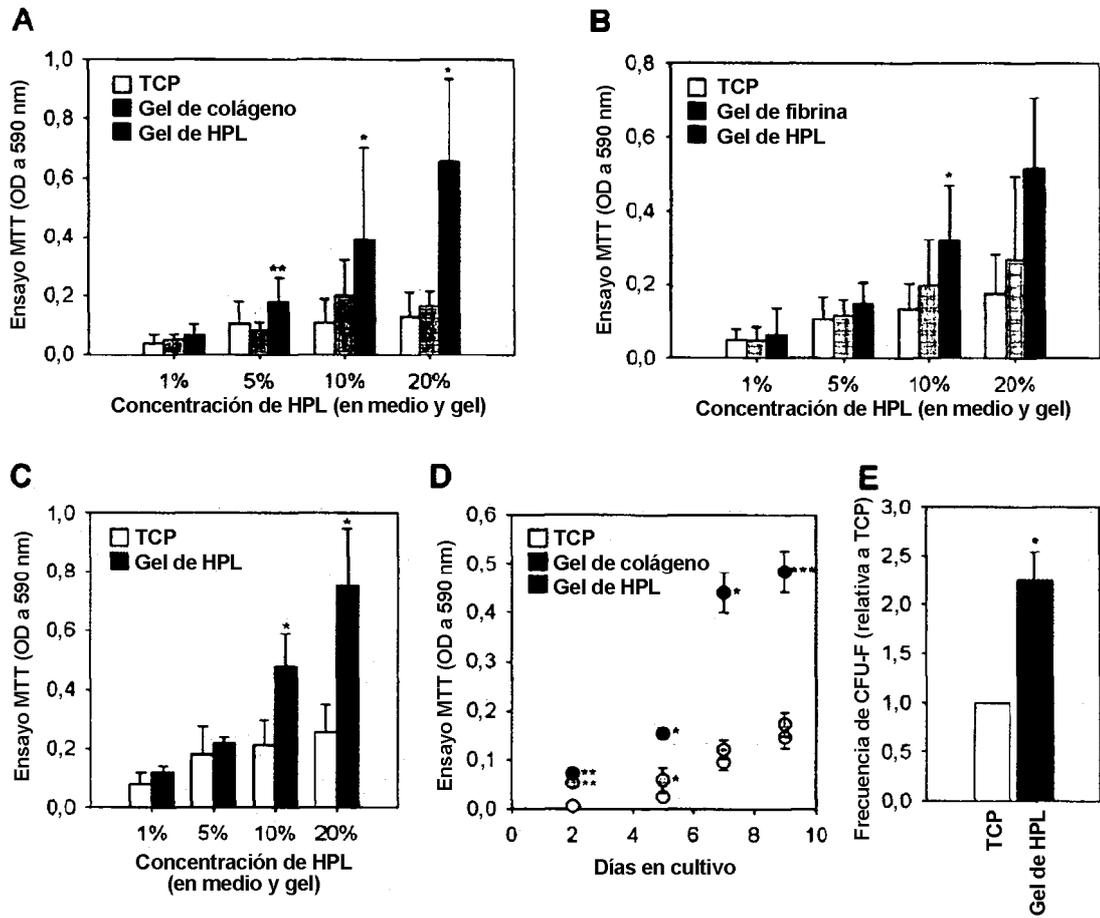


FIG. 8

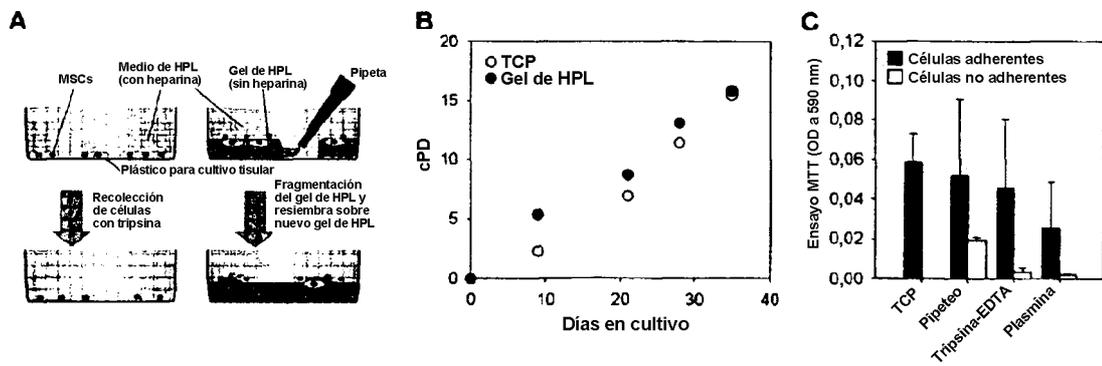


FIG. 9

