

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 555**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/071** (2010.01)  
**C12N 5/073** (2010.01)  
**C12N 5/074** (2010.01)  
**A61K 35/12** (2006.01)  
**A61K 35/51** (2015.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.06.2004 PCT/US2004/020822**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.01.2005 WO05001077**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2004 E 04777234 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016 EP 1641915**

54 Título: **Reparación y regeneración de tejido ocular usando células derivadas del post parto**

30 Prioridad:

**27.06.2003 US 483264 P**

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

**09.02.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 600 555 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).

**Reparación y regeneración de tejido ocular usando células derivadas del post parto****Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCION**

Esta invención se relaciona con el campo de la terapia basada en células o regenerativa para enfermedades y desórdenes oftalmológicos. Específicamente, la invención suministra composiciones farmacéuticas, dispositivos y métodos para la regeneración o reparación de células y tejidos en el ojo, usando células derivadas de postparto.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Puesto que el ojo es un órgano complejo del cuerpo, puede experimentar muchas enfermedades y otras condiciones perjudiciales que afectan su habilidad funcional normal. Muchas condiciones se asocian con el daño o degeneración de células oculares específicas, y tejidos que se componen estas células. Por ejemplo, las enfermedades y condiciones degenerativas del nervio óptico y de la retina son las causas más comunes de ceguera en este momento. El daño o degeneración de la córnea, los lentes y tejidos oculares asociados representan otra causa significativa de la pérdida de visión a nivel mundial.

La retina contiene siete capas de células alternativas y procesos que convierten una señal luminosa a una señal neural. Los fotonos de luz de la retina y epitelio pigmentario de la retina (RPE - de la retina pigment epithelium) componen una unidad funcional que, debido a muchos trastornos, pierde el balance por mutaciones genéticas o condiciones ambientales (incluyendo la edad) esto resulta en la pérdida de foto receptores debido a apoptosis o degeneración secundaria, que conlleva a una reducción progresiva de la vista y, en algunos casos, a la ceguera (para una revisión, refiérase a, por ejemplo, Lund, R.D. et al., 2001, Progress in De la retina and Eye Research - Progreso en investigación De la retina y Ocular) 20: 415-449). Dos tipos de enfermedades oculares que se clasifican dentro de esta tendencia son la degeneración macular relacionada con la edad (AMD - age-related macular degeneration) y retinosis pigmentaria (RP)

AMD es la causa más común de pérdida de visión en los Estados Unidos en aquellas personas que tiene 50 años o más, y su prevalencia se incrementa con la edad. El principal trastorno en AMD parece deberse a la disfunción RPE y cambios en las membranas de Bruch, por ejemplo, deposición de lípidos, vinculación cruzada de proteínas y baja en la unidad de nutrientes (referirse a Lund et al., 2001 *supra*). Una variedad de elementos podrían contribuir a la degeneración macular, incluyendo la composición genética, la edad, la nutrición, el cigarrillo y la exposición a la luz.

La RP es considerada un trastorno hereditario - más de 100 mutaciones han sido asociadas con la pérdida de foto receptores (referirse a Lund et al., 2001, *supra*). Aunque la mayoría de mutaciones se enfocan en los foto - receptores, algunas afectan directamente las células RPE. Juntas, estas mutaciones afectan procesos tales como el tráfico molecular entre foto receptores y células RPE y la foto transducción, por ejemplo.

Otras retinopatías menos comunes, pero también debilitadoras podrían involucrar una degeneración celular progresiva que puede conllevar a la pérdida de la visión y la ceguera. Éstas incluyen, por ejemplo, retinopatía diabética y la membrana neo vascular de la coroidea (CNVM - choroidal neovascular membrane). La retinopatía diabética podría calificarse como (1) no proliferativa o retinopatía de fondo, caracterizada por un incremento en permeabilidad capilar, edema, hemorragia, micro - aneurismas, y exudados, o (2) retinopatía proliferativa, caracterizada por una neo - vascularización que se extiende desde la retina hasta los vítreos, creando cicatrices, formaciones de tejidos fibrosos, y una separación potencial de la retina. En la CNVM, vasos sanguíneos anormales que se derivan de los coroides se extienden a lo largo de las capas de la retina. Los vasos nuevos frágiles se rompen fácilmente, causando que se acumulen sangre y fluido dentro de las capas de la retina.

Daños o degeneraciones progresivas del nervio óptico y otros nervios relacionados al ojo incluyen otra causa importante de la pérdida de la visión y de la ceguera. Un buen ejemplo es el glaucoma, una condición del ojo que se conforma de una combinación de enfermedades graves que causan la pérdida de la visión al dañar el nervio óptico. Una presión intraocular elevada (IOP - intraocular pressure) debido a un drenaje ocular inadecuado es la principal causa del glaucoma, pero también puede desarrollarse sin una IOP elevada. El glaucoma se puede desarrollar por el envejecimiento del ojo, o puede ocurrir como resultado de una lesión, inflamación, tumor ocular, o en casos avanzados de cataratas o diabetes, o puede ser causado por ciertos fármacos, tal como los esteroides. Las principales características de la neuropatía óptica del glaucoma incluyen los cambios de las propiedades de la cabeza del nervio óptico, una reducción en el número de células ganglionares retínales sobrevivientes, y la pérdida de la visión. Ha sido propuesto que una secuencia de eventos conllevan a la degeneración de la cabeza del nervio óptico con la muerte lenta de las células ganglionares retínales que se observan en la enfermedad, y que la secuencia de eventos puede ser desacelerada o prevenida por medio del uso de agentes neuro - protectores (Osborne et al., 2003, Eur. J. Ophthalmol. 13 (Supp 3): S19-S26).

El daño celular de las condiciones degenerativas también afecta a otras partes del ojo. Por ejemplo, las cataratas son una consecuencia de una u opacificación gradual de los lentes cristalinos. Se cree que una vez que esto empieza, el desarrollo de las cataratas se desarrolla a lo largo de uno o más senderos que culminan en el daño de las fibras de los lentes. Esta condición se la trata actualmente con una remoción y reemplazo quirúrgicos de los lentes afectados. Otro ejemplo involucra a la córnea y a los componentes conjuntivos vecinos que conforman la superficie ocular. El epitelio del limbo, ubicado entre la córnea y la conjuntiva bulbar, contiene células madre epiteliales de la córnea. Una deficiencia celular epitelial del limbo (LECD - Del limbo epithelial cell deficiency) es una condición que ocurre, por ejemplo, en el síndrome de Stevens-Johnson y quemaduras térmicas o químicas. LECD conlleva a menudo a un desbalance entre el epitelio corneal el epitelio conjuntivo en el cual la córnea es cubierta por células epiteliales conjuntivas invasoras, que comprometen severamente a la superficie de la córnea y afectan la agudeza visual (Nakamura, T. y Kinoshita, S., 2003. *Cornea* 22 (Supp. 1): S75-S80).

La reciente llegada de la terapia que se basa en células madres para la reparación y regeneración de tejidos suministran tratamientos prometedores para varias patologías de degeneración de células y trastornos oculares que se mencionaron anteriormente. Las células madres son capaces de auto renovarse y diferenciarse para generar una variedad de linajes celulares. El trasplante de aquellas células puede utilizarse como una herramienta clínica para reconstituir un tejido, restaurando de esa forma la funcionalidad fisiológica y anatómica. La aplicación de la tecnología de células madres es muy amplia, e incluye diseño de tejidos, entrega de terapia de genes, y terapia celular, en otras palabras, la entrega de agentes biológicamente terapéuticos a ubicaciones específicas en una forma exógena por medio de células o componentes celulares vivientes suministrados que producen o contienen aquellos agentes (para una revisión, referirse a Tresco, P.A. et al., 2000, *Advanced Drug Delivery Reviews* (Revisiones de Entregas Avanzadas de Fármacos) 42: 2-37).

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

Lodie et al. (2002) *Tissue Engineering* 8(5):739-751 describe el análisis de poblaciones distintas según los informes de células madre derivadas de médula ósea multipotentes.

Tremain et al. (2001) *Stem Cells* 19:408-418 describe el análisis microSAGE de 2.353 genes expresados en una colonia derivada de una célula individual de células madre mesenquimales humanas indiferenciadas.

La US 2003/032179 describe un método para extraer y recuperar células madre tipo embrionarias.

Mitchell et al. (2003) *Stem Cells* 21(1):50-60 describe que las células de la matriz de la gelatina de Wharton forma neuronas y glía.

La US 5.919.702 describe un método de producción para tejido de cartílago que usa células aisladas de gelatina de Wharton.

La WO 03/068937 describe células madre tipo embrionarias derivadas de placenta mamífera del post-parto.

Weiss et al. (2003) *Experimental Neurology* 182(2):288-299 describe células madre porcinas derivadas del tejido conector de la mucosa del cordón umbilical.

La US 2003/161818 describe cultivos, productos y métodos que usan células madre.

Van Hoffelen et al. (2003) *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 44(1):426-434 describe la incorporación de células progenitoras del cerebro murinas en la retina de mamíferos en desarrollo.

Un obstáculo para materializar el potencial terapéutico de la tecnología de células madre ha sido la dificultad de obtener suficientes números de células. Una fuente de células madre es el tejido embrionario o fetal. Las células madre embrionarias y progenitoras han sido aisladas de varias especies mamíferas, incluyendo humanos, y varios de esos tipos de células han mostrado su capacidad de auto renovación y expansión, así como de diferenciación a varios tipos de linajes celulares. En sistemas de modelos animales, se ha reportado que las células madre embrionarias se han diferenciado en fenotipos de células RPE, y también han mejorado la supervivencia de los foto receptores huéspedes después del trasplante (Haruta, M. et al., 2004, *Investig. Ophthalmol. Visual Sci.* 45: 1020-1025; Schraermeyer, U. et al., 2001, *Cell Transplantation* (Trasplante de Células) 10: 673-680). Sin embargo, la derivación de células madres de fuentes embrionarias o fetales ha levantado muchas preguntas éticas las cuales sería preferible evitar al identificar otras fuentes de células multi-potentes o pluri-potentes.

Un tejido adulto también puede producir células madres útiles para terapias ocular basada en células. Por ejemplo, las células madres de la retina y de la córnea en si pueden ser utilizadas para la terapia de reemplazo de células en el ojo. Adicionalmente, se ha reportado que las células madre neurales de los hipocampos se han integrado con la retina de huéspedes, adoptando ciertas características neurales y gliales (refiriéndose a Lund, R.L. et al., 2003, *J. Leukocyte Biol.* 74: 151-160). Las células madres neurales preparadas de la corteza fetal de rata han demostrado diferenciarse a lo largo de una ruta celular RPE después del trasplante al espacio sub de la retina de ratas

adultas Enzmann, V. et al., 2003, *Investig. Ophthalmol. Visual Sci.* 44: 5417-5422). Se ha reportado que células madres de médula ósea se han diferenciado en células neurales de la retina y foto receptores después de su trasplante en retinas huésped (Tomita, M. et al., 2002, *Stem Cells (Células Madre)* 20: 279-283; Kicic, A. et al., 2003, *J. Neurosci.* 23: 7742-7749). También se ha reportado una reconstrucción de superficie ocular en un sistema de modelo de conejo, utilizando células madre epiteliales cultivadas de la mucosa Nakamura, T. & Kinoshita, S., 2003, *supra*). Aunque estos reportes son prometedores para el uso de células progenitoras y madre adultas en la terapia que se basen células para el ojo, debe mencionarse que las poblaciones de células madre adultas son en comparación raras y a menudo sólo se las pueden obtener por medio de procedimientos invasivos. Además, las células madre adultas pueden tener una habilidad más limitada para expandirse en cultivos en comparación con las células madres embrionarias.

Por lo tanto, existe una necesidad de fuentes alternas de provisiones adecuadas de células que tengan la habilidad de tener compatibilidad, aumentar o reemplazar las funciones celulares perdidas en el ojo. Un suministro confiable, bien caracterizado y abundante de poblaciones sustancialmente homogéneas de aquellas células sería una ventaja para una variedad de aplicaciones diagnósticas y terapéuticas en la reparación y regeneración ocular, incluyendo ensayos de análisis de fármacos, soporte trófico *ex vivo* o *in vitro* de células oculares y de otros tipos, y terapias que se basan en células *in vivo*.

## RESUMEN DE LA INVENCION

La invención proporciona células multipotentes o pluripotentes aisladas del cordón umbilical humano para su uso en el tratamiento de un paciente que tiene una condición degenerativa ocular, en donde las células se pueden obtener del tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre y en donde las células tienen las siguientes características:

- a. potencial de experimentar al menos 40 duplicaciones en cultivo;
- b. unión y expansión en un recipiente de cultivo de tejido recubierto o sin recubrir, en donde el recipiente de cultivo de tejido recubierto comprende un recubrimiento de gelatina, laminina, colágeno, poliornitina, vitronectina o fibronectina;
- c. producción de vimentina y actina del músculo liso alfa;
- d. producción de cada uno de CD10, CD13, CD44, CD73, HLA-A,B,C, PDGFr-alfa y CD90 como se detectan por citometría de flujo;
- e. expresión aumentada de genes endógenos que codifican interleucina 8; reticulon 1; ligando 1 de quimiocinas (motivo C-X-C); ligando 3 de quimiocinas (motivo C-X-C); ligando 6 de quimiocinas (motivo C-X-C) y proteína 3 inducida por el factor de necrosis tumoral alfa en relación a la expresión endógena de interleucina 8, reticulon 1, ligando 1 de quimiocinas (motivo C-X-C); ligando 3 de quimiocinas (motivo C-X-C); ligando 6 de quimiocinas (motivo C-X-C) y proteína 3 inducida por el factor de necrosis tumoral alfa en una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal, o una célula de la médula ósea de las crestas ilíacas, como se caracterizan por matriz de oligonucleótidos;
- f. falta de producción de CD31, CD34, CD45, CD 117 y CD141 como se detectan por citometría de flujo;
- g. son capaces de auto-renovarse y expandirse;
- h. crecimiento en alrededor del 5% a alrededor del 20% de oxígeno;
- i. requieren L-valina para el crecimiento;
- j. carecen de expresión de HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86, B7-H2, HLA-G y CD 178 como se detectan por citometría de flujo;
- k. expresión de PD-L2 como se detecta por citometría de flujo;
- l. secreción de MCP-1, IL-6, GCP-2, IL-8, TIMP1, TPO, KGF, HGF, FGF, HBEGF y BDNF como se detectan por ELISA.
- m. falta de secreción de SDF-1 alfa, VEGF, TGF-beta2, ANG2 y PDGFbb como se detectan por ELISA; y
- n. una disminución en la expresión de los genes siguientes en relación a una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal, o una célula de la médula ósea de las crestas ilíacas como se ensayan por micromatriz: caja homeótica 2 de la baja estatura; proteína 2 de choque térmico de 27 kDa; ligando 12 de quimiocina (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células del estroma); elastina; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); caja homeótica 2 de mesénquima; homólogo 1 de caja homeótica de "sine oculis"; cristalina, alfa B; activador de morfogénesis 2 asociado a "dishevelled"; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralin 1; tetranectina; dominio tres de homología con src (SH3) y rico en cisteínas; gen 1 de translocación de linfocitos B, antiproliferativa; colesterol 25-hidroxilasa; factor de transcripción 3 relacionado con el enanismo; proteína hipotética FLJ23191; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de procolágeno C-endopeptidasa; homólogo 7 de "frizzled"; gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C; proteína de caja homeótica iroquois 5; hefaestina; integrina, beta 8; glicoproteína 2 de vesícula sináptica; ADNc FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor 1 similar al receptor de citocinas; canal de potasio activado por calcio de conductancia intermedia/baja, subfamilia N, miembro 4; proteína DKFZP586L151; coactivador de la transcripción con motivo de unión a PDZ (TAZ); homólogo 2 de caja homeótica de "sine oculis"; proteína KIAA1034; respuesta de crecimiento precoz 3; caja homeótica de "distal less" 5; proteína hipotética FLJ20373; familia 1 de aldo-ceto reductasas, miembro C3 (3-alfa hidroxisteroide deshidrogenasa, tipo II); biglicano; fibronectina 1; proencefalina; integrina, tipo beta 1 (con dominios de repetición similares a EGF); clon de ADNc EUROIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor de

5 péptido natriurético C/guanilato ciclasa C (receptor del péptido atrial natriurético C); proteína hipotética FLJ14054; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222); proteína de membrana asociada a vesícula 5; proteína 1 de la matriz extracelular tipo fibulina que contiene EGF; similar a proteína 3 de interacción con BCL2/adenovirus E1B de 19 kDa; proteína 1 de unión a AE; polipéptido 1 de la subunidad VIIa de la citocromo c oxidasa (músculo); neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; y proteína 2 de unión al factor de crecimiento insulinoide, 36 kDa.

10 La invención también proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una condición degenerativa ocular, que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad efectiva para tratar la condición degenerativa ocular de células multipotentes o pluripotentes de la invención. La invención también proporciona el uso de las células de la invención en la fabricación de un medicamento para tratar un paciente que tiene una condición degenerativa ocular.

15 Esta invención proporciona composiciones aplicables a terapia basada en células o regenerativa para enfermedades y trastornos oftálmicos. En particular, la invención ofrece composiciones farmacéuticas para la regeneración o reparación de tejido ocular usando células derivadas del tejido del cordón umbilical humano.

20 Un aspecto de la divulgación presenta una célula derivada del postparto, derivada del tejido de la placenta o del cordón umbilical sustancialmente libre de sangre, donde la célula es capaz de auto renovarse y expandirse en cultivos y tiene el potencial de diferenciarse en una célula de un fenotipo neural; donde la célula requiere L - valina para crecer y es capaz de crecer con por lo menos alrededor de un 5% de oxígeno. Esta célula tiene además una o más de las siguientes características: (a) el potencial de por lo menos 40 doblajes en cultivos; (b) la adherencia y expansión en portadores de cultivos de tejidos no cubiertos o cubiertos con gelatina, laminina, colágeno, polioritina, vitronectina, o fibronectina; (c) la producción de por lo menos un factor de tejido, vimentina, y actina de músculo liso alfa; (d) la producción de por lo menos uno de CD 10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, PD-L2 y HLA-A,B,C; (e) la falta de producción de por lo menos uno de CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G, y HLA-DR,DP,DQ,, tal como se detecte por citometría de flujo; (f) la expresión de un gen, que en relación a una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesénquima, o una célula de médula ósea de cresta iliaca, que se ha incrementado por lo menos un código genético de: interleucina 8; reticulon 1; ligando de quimioquina (motivo CXC) 1 (actividad estimulante de crecimiento de la melanoma, alfa); ligando de quimioquina (motivo C-X-C) 6 (proteína quimiotáctica de granulocitos 2); ligando de quimioquina (motivo C-X C-) 3; factor de necrosis tumoral, proteína inducida por alfa-3; miembro 2 de la súper - familia Lectina tipo C; Tumor de Wilms 1; miembro A2 de la familia aldehído deshidrogenasa 1; renina; receptor de lipoproteína oxidada de baja densidad 1; IMAGEN: 4179671 de clon de Homo sapiens; proteína quinasa C zeta; proteína hipotética DKFZp564F013; reducción en el cáncer de ovario 1; gen de Homo sapiens del clon DKFZp547k1113; (g) expresión de un gen, que en relación a una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesénquima, o una célula de médula ósea de cresta iliaca, que tiene reducida por lo menos una de las siguientes codificaciones genéticas: homeobox de corta estatura 2; proteína 27 kDa de golpe de calor 2; ligando de quimioquina (motivo C-X-C) 12 (factor derivado de célula estromal 1); elastina (estenosis aórtica supra - valvular, el síndrome de Williams-Beuren); ARNm de Homo sapiens; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); homeobox de mesénquimas 2 (homeobox que previene el crecimiento); homeobox homólogo de oculis sine 1 (Drosophila); cristalina, alfa B; activador asociado con la morfogénesis desalineada 2; Proteína DKFZP586B2420; similar al neuralin 1; tetranectina (proteína que vinculadora de plasminógenos); src árbol de homología tres (SH3 - src homology three) y dominio rico en cisteína; hidroxilasa - 25 de colesterol; factor de transcripción relacionado con enanismo - 3; receptor interleucina 11, alfa; potenciador de cadopeptidasa C de procolágeno; homólogo de frizzled (ensortijado) 7 (Drosophila); gen hipotético BC008967; colágeno, de tipo VIII, alfa 1; tenascina C (hexabrachion); proteína homeobox iroquois 5; hephaestin; integrina, beta 8; glicoproteínas de vesículas sinápticas 2; neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; proteína vinculadora del factor de crecimiento similar a la insulina 2, 36 kDa; ADNc FLJ12280 fis de Homo sapiens, clon MAMMA1001744; factor similar al receptor de citosina 1; canales activados por el calcio de conducción intermedia / pequeña del potasio, subfamilia N, miembro 4; integrina, beta 7; co - activador transcripcional con motivo de unión de PDZ-(TAZ); homólogo de homeobox oculis sine 2 (Drosophila); Proteína KIAA1034; proteína de membrana asociada a la vesículas 5 (myobrevin); proteína matricial extracelular similar a la -fibulina que contiene EGF- 1; respuesta de crecimiento temprano 3; homeobox cercana 5; proteína hipotética FLJ20373; familia aldoketo reductasa 1, miembro C3 (hidroxiesteroide deshidrogenasa lafa 3, tipo II); biglicano; co - activador transcripcional con motivo de vinculación PDZ-(TAZ); fibronectina 1; proencefalina; integrina, tipo beta-1 (con dominios repetidos similares a EGF); inserción de tamaño completo del ADNc del clon EUROIMAGE 1968422 en el ARNm de homo sapiens; EphA3; proteína KIAA0367;receptor de péptidos natriuréticos C / guanilato ciclasa C (receptor de péptidos atrionatriurético C); proteína hipotética FLJ14054; ARNm de homo sapiens; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222); BCL2 / proteína tipo tres que interactúa con el adenovirus E1B 19kDa; proteína de vinculación de AE 1; polipéptido de la subunidad VIIa citocromo de oxidasa del citocromo c (músculo); similar al neuralin 1; gen de translocación celular B 1; proteína hipotética FLJ23191; y DKFZp586L151; (h) secreción de por lo menos uno de MCP-1, IL-6, IL-8, GCP-2, HGF, KGF, FGF, HB-EGF, BDNF, TPO, MIP1a, RANTES, y TIMP1; y (i) la falta de secreción de por lo menos uno de TGF-beta2, ANG2, PDGFbb, MIP1b, 1309, MDC, y VEGF, tal como se detectó con ELISA.

65 La célula derivada de postparto de la invención es una célula derivada del tejido del cordón umbilical. En otras realizaciones de la divulgación es una célula derivada de la placenta. En realizaciones específicas de la divulgación, la

célula tiene las características identificativas de cualquiera de: tipo de célula PLA 071003 (P8) (Número de Acceso ATCC PTA-6074); tipo de célula PLA 071003 (P11) (Número de Acceso ATCC PTA-6075); tipo de célula PLA 071003 (P16) (Número de Acceso ATCC PTA-6079). En realizaciones específicas de la invención, la célula tiene todas las características identificativas de cualquiera de tipo de célula UMB 022803 (P7) (Número de Acceso ATCC PTA-6067); o el tipo de célula UMB 022803 (P17) (Número de Acceso ATCC PTA-6068).

En ciertas realizaciones, las células derivadas del cordón umbilical humano se aíslan en la presencia de una o más actividades enzimáticas que incluyen la actividad metaloproteasa, la actividad mucolítica y la actividad proteasa neutral. Preferiblemente, las células tienen un cariotipo normal, que se mantiene mientras las células son pasadas en cultivos. Las células derivadas de postparto de la invención incluyen a cada una de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, y HLA-A,B,C y no incluye ninguna de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, o HLA-DR,DP,DQ, como se detecta por citometría de flujo.

Otro aspecto de la invención destaca una población celular que incluye las células derivadas del cordón umbilical humano como se acaba de describir. En una realización, la población de las células derivadas del cordón umbilical es sustancialmente homogénea. En una realización específica, la población incluye una línea celular clónica de células derivadas del cordón umbilical humano. En otra realización, la población es heterogénea y se conforma de células derivadas del cordón umbilical humano y por lo menos otro tipo de células. En ciertas realizaciones, el otro tipo de célula puede ser astrocitos, oligodendrocitos, neuronas, progenitoras neurales, células madre neurales, células madre epiteliales de la retina, células madre epiteliales corneales u otras células madre multipotentes. En otras realizaciones, la población celular es cultivada en contacto con uno o más factores que estimulan la diferenciación de células madre hacia un linaje neural o epitelial.

También se destaca de acuerdo con esta divulgación un lisado celular preparado de células derivadas de postparto. El lisado de células podría separarse a una fracción de membrana enriquecida y a una fracción celular soluble. La divulgación también destaca una matriz extracelular producida por las células derivadas del postparto, así como un medio acondicionado en el cual las células han crecido.

Otro aspecto de la invención destaca las células para el uso en un método para el tratamiento de pacientes que tengan condiciones oculares degenerativas, que involucra la administración al paciente de células multipotentes o pluripotentes aisladas de tejidos de cordón umbilical de postparto, en una cantidad efectiva para tratar la condición ocular degenerativa. En ciertas realizaciones, la condición ocular degenerativa es una condición aguda tal como el trauma cerebral, el trauma del nervio óptico o una lesión ocular. En otras realizaciones, es una condición degenerativa crónica o progresiva, tal como la degeneración macular, retinosis pigmentaria, retinopatía diabética, glaucoma o deficiencia celular epitelial del limbo. En ciertas realizaciones, las células se inducen in vitro para diferenciarse a células de linajes neurales o epiteliales antes de su administración.

En ciertas realizaciones, las células son administradas con por lo menos otro tipo de células, como en el caso de astrocitos, oligodendrocito, neuronas, progenitores neurales, células madre neurales, células madre epiteliales de la retina, células madre epiteliales corneales, u otro tipo de célula madre multipotente. En estas realizaciones, el otro tipo de célula puede ser administrado simultáneamente con, o antes, o después, de las células derivadas de postparto. Asimismo, en estas otras realizaciones las células son administradas con por lo menos otro agente, tal como un fármaco para terapia ocular, u otro agente acompañante beneficioso tal como agentes anti inflamatorios, agentes anti apópticos, antioxidantes o factores de crecimiento. En estas realizaciones, el otro agente puede ser administrado simultáneamente, antes, o después de las células postparto.

En varias realizaciones, las células son administradas a la superficie de un ojo, o son administradas al interior de un ojo o a una ubicación cercana al ojo, por ejemplo, atrás del ojo. Las células pueden ser administradas por medio de una cánula o desde un dispositivo implantado en el cuerpo del paciente dentro o en la proximidad del ojo, o pueden ser administradas por implantes de una matriz o supercántigo que contenga a las células.

Otro aspecto de la invención destaca una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de pacientes que tengan condiciones degenerativas oculares, que involucra un portador farmacéuticamente aceptable y células multipotentes o pluripotentes aisladas de tejido de cordón umbilical postparto en una cantidad efectiva para tratar la condición degenerativa ocular. Las células de postparto son células derivadas del tejido del cordón umbilical humano como se acaba de describir. La condición degenerativa ocular puede ser una condición aguda, crónica o progresiva. En ciertas realizaciones, la composición incluye células que han sido inducidas in vitro para diferenciarse en células de linaje neural o epitelial antes de la formulación de la composición.

En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica incluye por lo menos otro tipo de células, tal como astrocitos, oligodendrocito es, neuronas, progenitores neurales, células madre neurales, células madre epiteliales de la retina, células madre epiteliales corneales, u otra célula madre multipotente. En esta u otras realizaciones, la composición farmacéutica incluye por lo menos otro agente, tal como un fármaco para tratar desórdenes degenerativos oculares u otro activo acompañante beneficioso, por ejemplo, agentes anti inflamatorios, agentes anti apópticos, antioxidantes o factores de crecimiento.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas son formuladas para su administración a la superficie del ojo. Alternativamente, pueden ser formuladas para su administración en el interior del ojo o en proximidad al ojo (por ejemplo, atrás del ojo). Las composiciones también pueden ser formuladas como una matriz o un supercóntigo que contenga las células.

De acuerdo a otro aspecto de la invención, se incluye un equipo para su uso en el tratamiento de pacientes que tengan condiciones degenerativas oculares. El equipo se conforma de un portador farmacéuticamente aceptable, una población de células multipotentes o pluripotentes de la invención aisladas de tejido de cordón umbilical de postparto, e instrucciones para utilizar el equipo en métodos para tratar a los pacientes. El equipo también puede contener uno o más componentes adicionales, tales como reactivos e instrucciones para el cultivo de células, o una población de por lo menos otro tipo de células, o uno o más activos útiles en el tratamiento de condiciones degenerativas oculares.

De acuerdo a otro aspecto de la divulgación, se suministra un método para tratar a pacientes que tengan condiciones degenerativas oculares, que involucra la administración a los pacientes de una preparación hecha de células multipotentes o pluripotentes aisladas de placentas o cordones umbilicales de postparto, en una cantidad efectiva para tratar las condiciones degenerativas oculares, cuya preparación involucra un lisado de células (o una fracción de esta) o un medio acondicionado en el cual crecieron las células, o una matriz extracelular de células. Preferiblemente, las células son derivadas de postparto como se acaba de describir. En otro aspecto, la divulgación destaca una composición farmacéutica que incluye un portador farmacéuticamente aceptable y una preparación hecha de células de postparto, que podría ser un lisado celular (o una fracción de este) de células postparto, en una matriz extracelular de estas o un medio acondicionado en el cual se cultivaron las células de postparto. Los equipos para practicar este aspecto de la divulgación también están incluidos. Esto podría incluir uno o más portadores farmacéuticamente aceptables u otro activo o reactivo, uno o más lisados de células o su fracción, una matriz extracelular o un medio acondicionado de células de postparto, e instrucciones para el uso de los componentes del equipo.

Otro aspecto de la invención destaca un método para incrementar la supervivencia, el crecimiento o la actividad de las células a ser trasplantadas para tratar desórdenes oculares degenerativos. El método involucra el cocultivo de células para el trasplante de células cultivadas derivadas de tejidos de la placenta o umbilicales de postparto, bajo condiciones efectivas para incrementar la supervivencia, el crecimiento o la actividad de las células a ser trasplantadas. Preferiblemente, las células de postparto son las células descritas anteriormente. Un equipo para practicar el método también se provee. El equipo incluye las células cultivadas de postparto e instrucciones para cocultivarlas para su trasplante con las células postparto bajo condiciones efectivas para incrementar la supervivencia, el crecimiento o la actividad de las células a ser trasplantadas.

Otras características y ventajas de esta invención serán evidentes después de leer las descripciones y ejemplos detallados a continuación.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

### Definiciones

A continuación se establecen varios términos usados a lo largo de la especificación y también se definen las declaraciones.

Las células madre son células que no han sido diferenciadas y que se definen por la habilidad de auto-renovarse individualmente, y de diferenciarse para producir células de progenie, incluyendo progenitores auto renovables, progenitores no renovables, y células diferenciadas terminalmente. Las células madres también se caracterizan por su habilidad a diferenciarse in vitro a células funcionales de varios linajes celulares de múltiples capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), así como para dar lugar a tejidos de múltiples capas germinales después de su trasplante, y para contribuir sustancialmente a la mayoría, o tal vez a todos, los tejidos después de su inyección a blastocistos.

Las células se clasifican de acuerdo a su desarrollo potencial como: (1) totipotentes; (2) pluripotentes; (3) multipotentes; (4) oligopotentes; y (5) unipotentes. Las células totipotentes pueden dar lugar a todos los tipos de células embrionarias y extra embrionarias. Las células pluripotentes pueden dar lugar a todo tipo de células embrionarias. Las células multipotentes incluyen aquellas que pueden dar lugar a un subconjunto de linajes celulares, pero todos dentro de un tejido, órgano o sistema fisiológico particular (por ejemplo, las células madre hematopoyéticas (HSC – hematopoietic stem cells) pueden producir progenies que incluyen HSC (auto renovación), progenitores oligopotentes restringidas a células sanguíneas, y todo tipo de células y elementos (por ejemplo, plaquetas) que son componentes normales de la sangre). Las células que son oligopotentes pueden dar lugar a un subconjunto más restringido de linajes celulares que las células madres multipotentes; y las células que son un y potentes pueden dar lugar a un linaje individual de células (por ejemplo, células madre espermatogénicas).

Las células madre también se categorizar en base a la fuente de donde fueron obtenidas. Una célula madre adulta es generalmente una célula no diferenciada multipotente encontrada en el tejido con múltiples tipos de células diferenciadas. La célula madre adulta puede renovarse. Bajo circunstancias normales, también puede diferenciarse para producir tipos especializados de células del tejido donde se originó, y posiblemente de otros tipos de tejidos.

5 Una célula madre embrionaria es una célula pluripotente de la masa celular interna de un embrión en etapa de blastocisto. Una célula madre fetal es una que se origina del tejido o membranas fetales. Una célula madre postparto es una célula multipotente o pluripotente que se origina sustancialmente del tejido embrionario disponible después de nacimiento, específicamente, de la placenta y del cordón umbilical. Se ha descubierto que estas células poseen propiedades características de células madre pluripotentes, incluyendo una proliferación rápida y el potencial para

10 diferenciarse en muchos linajes celulares. Las células madre postparto podrían ser entregados por la sangre (por ejemplo, como aquellas obtenidas de la sangre del cordón umbilical) o no entregados por la sangre (por ejemplo, como aquellos obtenidos de tejidos sin sangre del cordón umbilical y de la placenta).

15 El tejido embrionario es definido típicamente como tejido que se origina del embrión (que en los humanos corresponde al período desde la fertilización hasta alrededor de seis semanas de desarrollo. El tejido fetal se refiere al tejido que se origina del feto, que en los humanos corresponde al período desde alrededor de seis semanas de desarrollo hasta el parto. El tejido extra embrionario es el tejido asociado con, pero que no se origina de, el embrión o el feto. Los tejidos embrionarios incluyen membranas extra embrionarias (el corion, el amnios, el saco vitelino y los

20 alantoides), el cordón umbilical y la placenta (que en si forman el corion y la basal decidua materna).

La diferenciación es el proceso por el cual una célula no especializada (“no comprometida”) o menos especializada adquiere las características de una célula especializada, tal como una célula nerviosa o una célula de músculo, por ejemplo. Una célula diferenciada es una que ha tomado una posición más especializada (“comprometida”) dentro del linaje de una célula. El término comprometida, cuando se lo aplica al proceso de

25 diferenciación, se refiere a una célula que ha procedido en la ruta de diferenciación a un punto en el cual, bajo circunstancias normales, continuará a diferenciarse a un tipo de célula específico o subconjunto de tipos celulares, y no puede, bajo circunstancias normales diferenciarse a un tipo de célula diferente o revertirse a un tipo celular menos diferenciado. La des - diferenciación se refiere al proceso por el cual una célula se revierte a una posición menos especializada (o comprometida) dentro del linaje de una célula. Tal como se usa aquí, el linaje de una célula define la herencia de la célula, en otras palabras, de que célula proviene y a que células puede dar lugar. El linaje de una célula ubica a esta dentro de un esquema hereditario de desarrollo y diferenciación.

30

En un sentido amplio, una célula progenie ahora es una célula que tiene la capacidad de crear progenie que es más diferenciada que ella misma, y que a la vez retienen la capacidad para reabastecer la reserva de progenitores. Por tal definición, las células madre en si también son células progenitoras, tal como son los

35 precursores más inmediatos a las células diferenciadas terminalmente. Cuando esta invención se refiere a las células, en el sentido amplio que se usa continuación, esta definición amplia de célula progenitora puede ser utilizada. En un sentido menos amplio, una célula progenitora se define a menudo como una célula que es intermedia en el sendero de diferenciación, en otras palabras, surge de una célula madre y es intermedia en la

40 producción de un tipo de célula o subconjunto de tipos de células maduras. Este tipo de célula progenitora generalmente no puede auto renovarse. De esa misma forma, si este tipo de célula es referenciado en este documento, se usará el término célula progenitora no renovable o como una célula progenitora intermedia o una célula precursora.

45

Tal como se usa aquí, la frase diferenciarse en un linaje o fenotipo ocular se refiere a una célula que se vuelve parcial o completamente comprometida a un fenotipo ocular específico, incluyendo sin limitarse a, células madre de la retina y de la córnea, células epiteliales del pigmento de la retina y del iris, foto receptores, ganglios de la retina y otros linajes neurales ópticos (por ejemplo, glía de la retina, microglía, astrocitos, células de Mueller), de células que formen lentes cristalinos y células epiteliales de la esclera, córnea, limbo y conjuntiva. La frase

50 diferenciarse en un linaje o fenotipo neural se refiere a una célula que se vuelve parcialmente o completamente comprometida a un fenotipo neural específico del CNS o PNS, en otras palabras, una neurona o una célula glial, o la segunda categoría incluyendo pero sin limitarse a astrocitos, oligodendrocitos, células Schwann y micro glía.

Las células que se usan como ejemplo aquí y que son preferidas para el uso en esta invención son referidas generalmente como células derivadas de postparto (o PPDCs – postpartum derived cells). También podrían ser referidas a veces más específicamente como células derivadas de tejido de cordón umbilical o células derivadas de la placenta de la divulgación (UDCs - umbilical cord tissue-derived cells o PDCs - placenta-derived cells). Adicionalmente, las células pueden ser descritas como células madre no embrionarias o células progenitoras no

55 embrionarias, siendo usado el segundo término en un sentido más amplio. El término derivado es usado para indicar que las células han sido obtenidas de su fuente biológica y han sido cultivadas o manipuladas de otra forma in vitro (por ejemplo, cultivadas en un Medio de Crecimiento para expandir su población y / o producir una línea celular). La manipulación in vitro de células madre umbilicales y las características únicas de las células derivadas de tejido de cordón umbilical de esta invención se describen en detalle a continuación. Las células aisladas de tejido de cordón umbilical de postparto con otros métodos también son consideradas adecuadas para su uso en esta invención. Estas

60 otras células son referidas aquí como células de postparto (en vez de células derivadas de postparto).

65

Se usan varios términos para describir las células en cultivos. Los cultivos celulares se refieren en general a células tomadas de un organismo vivo y cultivadas bajo condiciones controladas (“en cultivos” o “cultivadas”). Un cultivo celular primario es un cultivo de células, tejidos, u órganos tomados directamente de un organismo antes del primer sub cultivo. Las células se expanden en el cultivo cuando se colocan en un medio de crecimiento bajo condiciones que facilitan el crecimiento y / o división celular, resultando en una población celular más grande. Cuando las células se expanden en cultivos, la tasa de proliferación de las células se mide a veces por la cantidad de tiempo necesario para que las células se doblen en número. Esto es referido como tiempo de doblaje.

Una línea celular es una población de células formada por uno o más sub - cultivos de un cultivo celular primario. Cada ronda de sub cultivos se conoce como un pase. Cuando las células son sub - cultivadas, se dice que han sido pasadas. Una población específica de células, o una línea celular, también son referidas a o caracterizadas por el número de veces que han sido pasadas. Por ejemplo, una población celular cultivada que ha sido pasada 10 veces puede ser referida como un cultivo P 10. El cultivo primario, en otras palabras, el primer cultivo después del aislamiento de las células del tejido, es designado P0. Después del primer sub cultivo, las células son descritas como un cultivo secundario (P1 o pase uno) después de segundo sub cultivo, las células se vuelven un cultivo terciario (P2 o pase dos), y así progresivamente. Se entiende para aquellas personas en la industria que podrían existir muchos doblajes poblacionales durante el período de pases; por lo tanto el número de doblajes poblacionales de un cultivo es mayor que el número de pases. La expansión de las células (en otras palabras, el número de doblajes poblacionales) durante el período entre los pases depende de muchos factores, incluyendo sin limitarse a la densidad de siembra, el medio del sub estrato, las condiciones de crecimiento y el tiempo entre pases.

Un medio acondicionado es un medio en el cual una célula o población específica de células ha sido cultivada, y después removida. Cuando las células son cultivadas en un medio, puede que secreten factores celulares que suministrarán soporte trófico a las otras células. Aquellos factores tróficos incluyen, pero no se limitan a hormonas, citoquinas, matrices extracelulares (ECM - extracellular matrix), proteínas, vesículas, anticuerpos y gránulos. El medio que contiene los factores celulares es el medio acondicionado.

Generalmente, un factor trófico se define como una sustancia que promueve la supervivencia, el crecimiento, la diferenciación, la proliferación y / o la maduración de una célula, o estimula un incremento en actividad de una célula. La interacción entre células por medio de factores tróficos puede ocurrir entre células de tipos diferentes. La interacción de células por medio de factores tróficos se encuentra esencialmente en todo tipo de células, y es una forma particularmente significativa de comunicación entre los tipos de células neurales. Los factores tróficos también pueden funcionar en una forma autócrina, en otras palabras, una célula puede producir factores tróficos que afectan su propia supervivencia, crecimiento, diferenciación, proliferación y / o maduración.

Quando se haga referencia a células vertebradas cultivadas, el término senectud (también senectud replicante o senectud celular) se refiere a una propiedad atribuible a cultivos celulares finitos; específicamente, su incapacidad de crecer más allá de un número finito de doblajes de población (a veces referido como el límite de Hayflick). Aunque la senectud celular fue descrita usando células tipo fibroblastos, la mayoría de células humanas normales que pueden crecer exitosamente en un cultivo experimentan senectud celular. La duración de vida in vitro de los diferentes tipos celulares varía, pero la máxima duración de vida es comúnmente menos de 100 doblajes de población (este es el número de doblajes totales para todas las células en el cultivo para alcanzar la senectud y por lo tanto que este cultivo ya no podrá dividirse más después de eso). La senectud no depende de un tiempo cronológico, pero en vez de eso se mide por el número de divisiones celulares, o doblajes de población, que el cultivo ha experimentado. Por lo tanto, las células se vuelven inactivas al remover factores esenciales de crecimiento y pueden retomar el crecimiento y la división cuando los factores de crecimiento son re-introducidos, y después de eso experimentarían la misma cantidad de doblajes que si hubieran crecido continuamente. Similarmente, cuando las células son congeladas en nitrógeno líquido después de varios números de doblajes de población y después se descongelan y se cultivan, estas experimentan sustancialmente el mismo número de doblajes que si las células se hubieran mantenido sin congelarse en el cultivo. Las células que alcanzan la senectud no están muertas o son moribundas; estas son de hecho resistentes a la muerte programada celular (apoptosis), y se han mantenido en su Estado no divisorio por períodos tan largos como tres años. Estas células están muy vivas y son muy activas metabólicamente, pero no se dividen. El Estado no divisorio de las células que han alcanzado la senectud todavía no ha podido ser reversible con ningún agente biológico, químico o viral.

Los términos ocular, oftálmico y óptico son usados intercambiabilmente en este documento para definir “de, o acerca, o relacionado con el ojo”.

El término condición (o aflicción) ocular degenerativa es un término inclusivo que abarca condiciones, desórdenes o enfermedades agudas y crónicas del ojo, incluyendo la conexión neural entre el ojo y el cerebro, relacionado con el daño, degeneración o pérdida celular. Una condición ocular degenerativa puede relacionarse con la edad, o podría resultar de una lesión o un trauma, o podría estar relacionada a una enfermedad o afección específica. Condiciones degenerativas oculares agudas incluyen, pero no están limitadas a, condiciones asociadas con la muerte o el compromiso celular que afecte el ojo incluyendo condiciones que surjan de insuficiencia cerebrovascular, trauma cerebral focal o difuso, daño cerebral difuso, condiciones infecciosas o inflamatorias del ojo, ruptura o separación de la retina, lesiones intraoculares (contusión, penetración, compresión, laceración) u otra

lesión física (por ejemplo quemadas físicas o químicas). Las condiciones degenerativas oculares crónicas (incluyendo condiciones progresivas) incluyen, pero no están limitadas a, retinopatías y otros desórdenes de la retina / macro - oculares tales como retinosis pigmentaria (RP), degeneración macular relacionada con la edad (AMD - age-related macular degeneration), membrana neovascular coroidea (CNVM - choroidal neovascular membrane);  
 5 retinopatías tales como retinopatía diabética, retinopatía oclusiva, retinopatía de células falciformes y retinopatía hipertensiva, oclusión de vena de la retina central, estenosis de la arteria carótida, neuropatías ópticas tales como glaucoma y síndromes relacionados; desórdenes de los lentes y del ojo exterior, por ejemplo, deficiencia de las células madre del limbo (LSCD - del limbo stem cell deficiency), también referida como deficiencia celular epitelial del limbo (LECD - del limbo epithelial cell deficiency), tal como ocurre en una lesión química o térmica, el síndrome de  
 10 Steven-Johnson, queratopatía inducida por lentes de contacto, Penfigoide cicatricial ocular, enfermedades congénitas de aniridia o displasia ectodérmica, varias deficiencias endocrinas asociadas con la queratitis.

El término tratamiento (o tratamiento de) una condición degenerativa ocular se refiere a mejorar los efectos de, o retrasar, interrumpir o revertir el progreso de, o retrasar o prevenir el inicio de, una condición degenerativa ocular tal como se define aquí.  
 15

El término cantidad efectiva se refiere a una concentración o cantidad de un reactivo o composición farmacéutica, tal como un factor de crecimiento, activo de diferenciación, factor trófico, población celular u otro agente, que es efectivo para producir los resultados esperados, incluyendo el crecimiento celular y / o la diferenciación in vitro o in vivo, o el tratamiento de condiciones degenerativas oculares, como se describe aquí. En relación a los factores de crecimiento, una cantidad efectiva podría variar entre alrededor de 1 ng por mililitro hasta  
 20 alrededor de 1 µg por mililitro. En relación a las PPDCs administradas a pacientes in vivo, una cantidad efectiva puede variar desde tan pocos como algunos cientos o menos hasta tantos como algunos millones o más. En realizaciones específicas, una cantidad efectiva puede variar desde  $10^3$ - $10^{11}$ , más específicamente de por lo menos alrededor de  $10^4$  células. Sería apreciado que el número de células a ser administrado dependa de los datos específicos del desorden a ser tratado, incluyendo pero sin limitarse al tamaño o al volumen total / área de superficie a ser tratada, así como la proximidad del lugar de administración a la ubicación de la región a ser tratada, entre otros factores familiares al biólogo médico.  
 25

Los términos período efectivo (o tiempo) y condiciones efectivas se refieren a un período de tiempo u otras condiciones controlables (por ejemplo, temperatura, humedad para métodos in vitro), necesarias o preferidas para que una composición necesaria o preferida de activos farmacéuticos alcance los resultados deseados.  
 30

El término paciente o sujeto se refiere a animales, incluyendo mamíferos, preferiblemente humanos, que son tratados con las composiciones farmacéuticas o de acuerdo a los métodos aquí descritos.  
 35

El término portador (o medio) farmacéuticamente aceptable, que podría ser usado intercambiamente con el término portador o medio biológicamente compatible, se refiere a reactivos, células, compuestos, materiales, composiciones, y / o formas de dosis que además de ser compatibles con las células y otros agentes a ser administrados terapéuticamente, están dentro del alcance de un juicio médico sólido, apropiado para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otra complicación excesivas y tomando en cuenta que tenga una tasa de beneficio / riesgo conmensurada.  
 40

Algunos términos se usan aquí en referencia a la terapia de reemplazo de células. Los términos transferencia autóloga, trasplante autólogo, autoinjerto y similares se refieren a tratamientos donde el donante celular también es el receptor de la terapia de reemplazo celular. Los términos transferencia alogénica, trasplante alogénico, aloinjerto y similares se refieren a tratamientos donde el donante de células es de la misma especie que el receptor de la terapia de reemplazo de células, pero no es el mismo individuo. Una transferencia de células en la cual la compatibilidad de las células del donante ha sido emparejada con un receptor se refiere a veces como una transferencia singénica. Los términos transferencia xenogénica, trasplante xenogénico, xeno - injerto y similares se refieren a tratamientos donde el donante celular es de una especie diferente al receptor de la terapia de reemplazo de células.  
 45  
 50

### **Descripción**

 55

Las condiciones degenerativas oculares, que cubren desórdenes y enfermedades agudas, crónicas y progresivas que tienen diferentes razones, tienen una característica en común de la disfunción o pérdida de un grupo específico o vulnerable de células oculares. Esta similitud permite el desarrollo de métodos terapéuticos similares para la reparación o regeneración de tejidos oculares vulnerables que han sido dañados o perdidos, a través, específicamente de terapias que se basan en células. El desarrollo de la terapia celular para condiciones oculares degenerativas ha sido limitado comparativamente a unos pocos tipos de células madre o progenitoras, incluyendo las células madres derivadas oculares en sí (por ejemplo, las células madre de la retina y corneales), células madre embrionarias y algunos tipos de células madres o progenitoras (por ejemplo, células madre neurales, mucosa sales, epiteliales y de médula ósea). Los inventores han identificado una nueva fuente significativa de células madre para este propósito, más específicamente, células aisladas de la placenta y del cordón umbilical de postparto. En esa misma forma, en sus varias realizaciones aquí descritas, esta invención destaca composiciones  
 60  
 65

farmacéuticas para su uso en la reparación y regeneración de tejidos oculares, que se basan en el uso de células progenitoras y poblaciones celulares aisladas de tejidos de postparto. La invención es aplicable a cualquier condición degenerativa ocular, pero se espera que sea particularmente apropiado para varios trastornos oculares para los cuales el tratamiento o la cura hasta este punto han sido difíciles o no han existido. Estos incluyen, pero no se limitan a, degeneración macular relacionada con la edad, retinosis pigmentarias, retinopatía diabética o de otro tipo, el glaucoma, y otras neuropatías ópticas, y trastornos asociados con la deficiencia de las células madres del limbo.

Las células madre o progenitoras aisladas del tejido del cordón umbilical de postparto de acuerdo a cualquier método conocido en la industria se espera que sean apropiadas para su uso en esta invención. En una realización principal, sin embargo, la invención utiliza células derivadas de postparto (PPDCs) como se acaba de definir, que se derivan del tejido del cordón umbilical que es libre de sangre, preferiblemente de acuerdo al método establecido a continuación. Las PPDCs son capaces de auto - renovarse y de expandirse en cultivos y tienen el potencial de diferenciarse en células de otros fenotipos ciertas realizaciones destacan poblaciones, composiciones farmacéuticas o componentes y productos que contienen esas células, y métodos para el uso de las composiciones farmacéuticas para el tratamiento de pacientes con condiciones degenerativas agudas o crónicas. Las células derivadas de postparto han sido caracterizadas por sus propiedades de crecimiento en cultivos, por sus marcadores de superficie celulares, por su expresión genética, por su habilidad de producir ciertos factores tróficos bioquímicos, y por sus propiedades inmunológicas.

### **Preparación de PPDCs**

De acuerdo a los métodos aquí descritos, la placenta y el cordón umbilical de mamíferos se recupera en el momento o un poco después de la finalización de embarazos de duración completa o parcial, por ejemplo, después de la expulsión en el nacimiento. El tejido postparto puede ser transportado desde el lugar del nacimiento hasta un laboratorio en un contenedor estéril tal como un matraz, vaso de precipitados, platos de cultivos, o una bolsa. El contenedor podría tener una solución o un medio, incluyendo pero sin limitarse a una solución salina, tal como, por ejemplo, el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium) o tampón de fosfato salino (PBS - phosphate buffered saline), o cualquier solución usada para el transporte de órganos utilizados para trasplantes, tal como la solución de University of Wisconsin o una solución perfluorada. Uno o más agentes antibióticos y / o antimicóticos que incluyen pero no se limitan a la penicilina, estreptomina, anfotericina B, gentamicina y nistatina, podrían agregarse al medio o al tampón. El tejido de postparto puede ser enjuagado con una solución anticoagulante tal como una solución que contenga heparina. Es preferible mantener el tejido alrededor de 4 - 10 °C antes de la extracción de las PPDCs. Es aún más preferible que el tejido no se ha congelado antes de la extracción de las PPDCs.

El aislamiento de las PPDCs debe ocurrir preferiblemente en un entorno aséptico. El cordón umbilical podría separarse de la placenta por medios conocidos en la industria. Alternativamente, del cordón umbilical y la placenta son utilizados sin separación. La sangre y los vestigios son removidos preferiblemente del tejido de postparto antes del aislamiento de las PPDCs. Por ejemplo, el tejido de postparto podría lavarse con una solución de amortiguamiento, tal como pero sin limitarse a tampón fosfato salino. El enjuague de amortiguador también puede incluir uno o más agentes antimicóticos y / o antibióticos, tales como pero sin limitarse a penicilina, estreptomina, anfotericina B, gentamicina y nistatina.

De acuerdo a una realización de la divulgación, el tejido de postparto que incluye a toda la placenta o un fragmento o una parte de esta se separa por fuerza mecánica (fuerzas de desmenuce o de ruptura). En una realización importante, el procedimiento de aislación también utiliza un proceso de digestión enzimática. Muchas enzimas son conocidas en la industria por su utilidad para aislar células individuales de matrices complejas de tejidos para facilitar el crecimiento en cultivos. Variando desde una digestión débil (por ejemplo, desoxirribonucleasas y proteasas neutrales, dispasas) a una digestión fuerte (por ejemplo, papaína y tripsina), aquellas enzimas están disponibles comercialmente. Una lista no exhaustiva de enzimas compatibles con este proceso incluyen actividades enzimáticas mucolíticas, metaloproteasas, proteasas neutrales, proteasas serinas (tal como la tripsina, la quimotripsina o la elastasa), y desoxirribonucleasas. Actualmente se prefieren las actividades enzimáticas seleccionadas de actividades metaloproteasas, proteasas neutrales y mucolíticas. Por ejemplo, las colagenasas son conocidas por su utilidad en el aislamiento de varias células de tejidos. Las desoxirribonucleasas pueden digerir ADN monocatenario y pueden minimizar el aglutinamiento de células durante el aislamiento. Los métodos preferidos involucran tratamiento enzimático con, por ejemplo, colagenasa dispasa, o colagenasa, dispasa y hialuronidasa, y aquellos métodos son provistos en las realizaciones en las que se prefiere, una mezcla de colagenasa y la dispasa proteasa neutral son usadas en el paso de separación. Aún más ideal son aquellos métodos que utilizan digestión en la presencia de por lo menos una colagenasa del *Clostridium histolyticum*, y cualquiera de las actividades proteasas, dispasa y termolisina. Aún más preferidos son los métodos que utilizan digestión con ambas actividades enzimáticas de la colagenasa y la dispasa. Técnicos con experiencia apreciará que muchos de estos tratamientos enzimáticos son conocidos en la industria para el aislamiento de células de varias fuentes de tejidos. Por ejemplo, las series de combinaciones enzimáticas de LIBERASE Blendzyme (Roche) son apropiadas para su uso en métodos instantáneos. Otras fuentes de enzimas son conocidas, y el técnico con experiencia también pueden obtener esas enzimas directamente de sus fuentes naturales. El técnico con experiencia en esta equipado para evaluar enzimas nuevas, o adicionales o combinaciones enzimáticas por su utilidad en el aislamiento de las

células de la invención. Los tratamientos enzimáticos preferidos duran 0.5, 1, 1.5, o 2 horas o más. En otras realizaciones importantes, el tejido es incubado a 37 °C durante el tratamiento enzimático del paso de separación.

5 En algunas realizaciones de la invención el tejido de postparto es separado en secciones que contienen varios aspectos del tejido. Las secciones separadas se disocian entonces por disociación mecánica y / o enzimática de acuerdo a los métodos descritos aquí. Las células de linaje neonatal o maternal pueden identificarse por cualquier método conocido en la industria, por ejemplo, por análisis de cariotipos o hibridación in situ para un cromosoma Y.

10 Las células aisladas o el tejido de postparto de donde crecen las PPDCs podrían utilizarse para iniciar, o sembrar, cultivos celulares. Las células aisladas se transfieren a portadores estériles de cultivos de tejidos ya sean sin cobertura o cubiertos por una matriz extracelular o ligandos tales como laminina, el colágeno (nativo, desnaturalizado o vinculado transversalmente), gelatina, fibronectina, y otras proteínas de matrices extracelulares. Las PPDCs se cultivan en cualquier medio de cultivo que sean capaces de sostener el crecimiento de las células  
15 tales como, pero sin limitarse a, DMEM (de alta o baja glucosa), DMEM avanzada, DMEM/MCDB 201, medio basal de Eagle, medio F10 de Ham (F 10), medio F 12 de Ham (F 12), medio de Iscove modificado por Dulbecco, medio de crecimiento de células madre mesénquimas (MSCGM - Mesenchymal Stem Cell Growth Medium), DMEM/F12, RPMI 1640, y CELL-GRO-FREE. El medio de cultivo podría suplementarse con uno o más componentes incluyendo, por ejemplo, suero bovino fetal (FBS - fetal bovine serum), preferiblemente alrededor de del 2 - 15% (volumen / volumen); suero equino (ES - equine serum); suero humano (HS - human serum); betamerceptoetanol (BME o 2-  
20 ME), preferiblemente alrededor de un 0.0 01% (volumen / volumen); uno o más factores de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF - platelet-derived growth factor), factor de crecimiento epidérmico (EGF - epidermal growth factor), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF - fibroblast growth factor), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF - vascular endothelial growth factor), factor de crecimiento similar a la insulina - 1 (insulin-like growth factor-1), factor inhibidor de leucocitos (LIF - leukocyte inhibitory factor) y eritropoyetina; aminoácidos, incluyendo L-valina, y uno o más agentes antibióticos y / o antimicóticos para controlar la  
25 contaminación microbiana, tal como, por ejemplo, la penicilina G, sulfato de estreptomina, anfotericina B, gentamicina, y distatina ya sean solas o en combinación. El medio de cultivo incluye preferiblemente un medio de crecimiento (DMEM - de baja glucosa, suero, BME, y un agente antibiótico).

30 Las células se siembran en portadores de cultivo a una densidad que permita el crecimiento celular. En una realización importante, las células se cultivan a alrededor de cero hasta 5% del volumen de CO<sub>2</sub> en el aire. En algunas realizaciones importantes, las células se cultivan a alrededor de dos a 25% de O<sub>2</sub> en el aire, preferiblemente alrededor de cinco a 20% de O<sub>2</sub> en el aire. Las células se cultivan preferiblemente alrededor de 25 a 40 °C y más preferiblemente se cultivan a 37 °C. Las células se cultivan preferiblemente en una incubadora. El medio en el  
35 portador de cultivo puede ser estático o puede ser agitado, por ejemplo, usando un bio - reactor. Se cultivan preferiblemente las PPDCs en condiciones de bajo estrés oxidativo (por ejemplo, con la adición de glutatión, vitaminas C, catalasa, vitamina E, N- acetilcisteína). El término "bajo estrés oxidativo", como se utiliza aquí, se refiere a condiciones donde no exista o exista un daño radicalmente mínimo a las células cultivadas.

40 Los métodos para la selección del medio de cultivo más apropiado, preparación del medio, y para técnicas de cultivo celular son conocidas en la industria y están descritas en varias fuentes incluyendo Doyle et al., (eds.), 1995, CELL & TISSUE CULTURE: LABORATORY PROCEDURES (CULTIVO CELULAR Y DE TEJIDOS: PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO), John Wiley & Sons, Chichester; y Ho and Wang (eds.), 1991, ANIMAL CELL BIOREACTORS (BIO - REACTORES DE CÉLULAS ANIMALES), Butterworth-Heinemann, Boston.  
45

Después de cultivar las células aisladas o los fragmentos de tejidos durante un período de tiempo suficiente, las PPDCs habrán crecido, ya sea por un resultado de migración desde el tejido de postparto o por división celular, o por ambos factores. En algunas realizaciones de la invención, las PPDCs son pasadas, o removidas a un portador de cultivos separado que contienen un medio fresco del mismo tipo o un tipo diferente que el que se usó inicialmente, donde la población celular se expandió mitóticamente. Las células de la invención pueden ser utilizadas en cualquier momento entre el pase cero y la senectud. Las células son pasadas preferiblemente entre  
50 alrededor de tres a 25 veces, es más preferible que sean pasadas entre 4 y 12 veces, y más aún entre 10 y 11 veces. Se puede realizar clonación y / o sub clonación para confirmar que una población clónica de células ha sido aislada.

55 En algunos aspectos de la invención, los tipos diferentes de células presentes en el tejido de postparto se fraccionan a sub-poblaciones de las cuales las PPDCs pueden ser aisladas. Esto puede lograrse usando técnicas estándar de separación celular incluyendo, pero sin limitarse a, tratamiento enzimático para vice asociar el tejido postparto en sus células componentes, seguido de un clonaje y selección de tipos específicos de células, por  
60 ejemplo pero sin limitarse a la selección basada en marcadores morfológicos y / o bioquímicos; cultivo selectivo de las células deseadas (selección positiva, destrucción selectiva de células no deseadas (selección negativa; separación basada en un aglutinamiento celular diferencial en la población mixta de acuerdo a, por ejemplo, el aglutinamiento de la soya; procedimientos de congelamiento-descongelamiento; propiedades de adherencia diferencial de las células en la población mixta; filtración; centrifugación convencional y zonal; elutriación centrífuga  
65 (centrifugación en contra de la corriente); separación de unidades usando la gravedad; distribución contracorriente; electroforesis; y clasificación de células por fluorescencia activada (FACS - fluorescence activated cell sorting). Para

una revisión de técnicas de selección clónica y separación celular, refiérase a Freshney, 1994, CULTURE OF ANIMAL CELLS: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUES (CULTIVOS DE CÉLULAS ANIMALES: UN MANUAL DE TÉCNICAS BÁSICAS), 3ra Ed., Wiley-Liss, Inc., Nueva York.

5 El medio de cultivo se cambia como sea necesario, por ejemplo, aspirando cuidadosamente el medio del plato, por ejemplo, con una pipeta, y reabasteciendo con un medio fresco. Se continúa con la incubación hasta que un número o densidad suficiente de células se acumule en el plato. Las realizaciones originales de tejido es plantado  
10 podrían removerse y las células que quedan tripnizarse usando técnicas estándar o un escarbado celular. Después de la tripnización, las células se recolectan, se remueven a un medio fresco y se incuban como se acaba de mencionar. En algunas realizaciones, el medio se cambia por lo menos una vez cada 24 horas después de la tripnización para remover cualquier célula flotante. Las células que quedan en el cultivo se consideran como PPDCs.

15 Las PPDCs pueden ser conservadas criogénicamente. De esa misma forma, en una realización importante descrita en mayor detalle a continuación, las PPDCs utilizadas para una transferencia autóloga (ya sea de la madre o del niño) pueden derivarse de tejidos apropiados de postparto después del nacimiento de un niño, después pueden ser conservadas criogénicamente para que estén disponibles en caso de que lleguen a necesitarse posteriormente hará un trasplante.

### 20 **Características de las PPDCs**

25 Las PPDCs podrían caracterizarse, por ejemplo, por propiedades de crecimiento (por ejemplo, capacidad de doblaje de población, tiempo de doblaje, pases hasta la senectud), análisis de cariotipos (por ejemplo, cariotipos normales; linaje maternal o neonatal), citometría de flujo (por ejemplo, análisis FACS), inmunohistoquímica y / o inmunocitoquímica (por ejemplo, para la detección de epítomos), perfil de expresión genética (por ejemplo, ensayos de chips genéticos; reacción en cadena de polimerasas (por ejemplo, PCR transcriptasa inversa, PCR en tiempo real, y PCR convencional)), ensayos de proteínas, secreción proteínica (por ejemplo, por ensayos de aglutinamiento de plasma o análisis del medio acondicionado de PPDCs, por ejemplo, Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA - Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)), reacción de linfocitos mixtos (por ejemplo, como medida de estimulación de las PBMCs), y / u otros métodos conocidos en la industria.

30 Ejemplos de PPDCs divulgadas en la presente derivadas del tejido de la placenta se depositaron con la American Type Culture Collection (ATCC - Colección Americana de Tipos de Cultivo, Manassas, VA) y se les asignó números de acceso ATCC de la siguiente forma: (1) la cepa designada PLA 071003 (P8) fue depositada el 15 de junio de 2004 y se le asignó el número de acceso PTA-6074; (2) la cepa designada PLA 071003 (P11) fue depositada el 15 de junio de 2004 y se le asignó el número de acceso PTA-6075; y (3) la cepa designada PLA 071003 (P16) fue depositada el 16 de junio de 2004 y se le asignó el número de acceso PTA-6079. Ejemplos de PPDCs derivados de tejido umbilical fueron depositados en la American Type Culture Collection el 10 de junio de 2004 y se asignaron números de acceso ATCC de la siguiente forma: (1) la cepa designada UMB 022803 (P7) se le asignó el número de acceso PTA-6067; y (2) la cepa designada UMB 022803 (P17) se le asignó el número de acceso PTA-6068.

35 40 En varias realizaciones, las PPDCs poseen una o más de las siguientes características de crecimiento (1) requieren L - valina para crecer en cultivos; (2) son capaces de crecer en atmósferas que contienen oxígeno a alrededor de un 5% hasta alrededor de un 20% (3) tienen el potencial de por lo menos 40 doblajes en cultivos antes de alcanzar la senectud; y (4) se adhieren y expanden a portadores cubiertos o no cubiertos de cultivos de tejidos, en donde la cobertura de los portadores de cultivos de tejidos incluyen coberturas de gelatina, laminina, colágeno, poliornitina, vitronectina o fibronectina.

45 50 En ciertas realizaciones las PPDCs poseen un cariotipo normal, que se mantiene mientras las células son pasadas. Un análisis de cariotipos es particularmente útil para identificar y distinguir células neonatales de maternas que se derivan de la placenta. Los métodos para analizar los cariotipos están disponibles y son conocidos por los técnicos en la industria.

55 60 En otras realizaciones de la divulgación, las PPDCs podrían caracterizarse por su producción de ciertas proteínas, incluyendo (1) la producción de por lo menos un factor de tejidos, vimentina, y actina de músculo liso-alfa; y (2) la producción de por lo menos uno de los marcadores de superficie CD 10, CD 13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, PD-L2 y HLA-A,B,C, como se detectó por citometría de flujo. En otras realizaciones, las PPDCs de la divulgación podrían caracterizarse por una falta de producción de por lo menos uno de los marcadores de superficie CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G, y HLA-DR,DP,DQ, como se detectó por citometría de flujo. Son particularmente preferidas las células que producen por lo menos 2 de los factores de tejidos, vimentina, y actina de músculo liso - alfa. Más preferidos aún son aquellas células que producen las tres de factores proteínicos de tejido, vimentina y actina de músculo liso - alfa.

65 En otras realizaciones, las PPDCs podrían caracterizarse por su expresión genética, que en relación a células humanas de fibroblastos, células madre mesénquimas, o células de médula ósea iliaca, tienen un incremento de codificación genética de por lo menos una de interleucina 8; retículo 1; ligando de quimioquina (motivo C-X-C) 1

5 (actividad estimuladora del crecimiento de melanoma, alfa) ligando de quimioquina (motivo C-X-C) 6 (granulocito, proteína quimiotáctica 2); ligando de quimioquina (motivo C-X-C) 3; factor de necrosis tumoral, proteína inducida por alfa-3; miembro 2 de la súper - familia Lectina de tipo C; Tumor de Wilms 1; miembro A2 de la familia aldehído deshidrogenasa 1; renina; receptor de lipoproteína oxidada de baja densidad 1; clon IMAGEN: 4179671 de Homo sapiens; proteína quinasa C zeta; proteína hipotética DKFZp564F013; reducción en el cáncer de ovario 1; y el gen de Homo sapiens del clon DKFZp547k1113.

10 En otras realizaciones, las PPDC pueden caracterizarse por expresión genética, que en relación a una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesénquima, o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, es reducida para una codificación genética de por lo menos uno de: homeobox de estatura corta 2; proteína 27 kDa de golpe de calor 2; ligando de quimioquina (motivo C-X-C) 12 (factor derivado de células estromales 1); elastina (estenosis aórtica supra valvular, síndrome Williams-Beuren); ARNm de homo sapiens; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); homeobox de mesénquima 2 (homeobox específico que previene el crecimiento); homólogo 15 1 de homeobox sine oculis (Drosophila); cristalina, alfa B; activador asociado con morfogénesis desalineada 2; proteína DKFZP586B2420; similar a la neuralina 1; tetranectina (proteína que vincula el plasminógeno); homología de src 3 (HS3 - src homology three) y el dominio rico en cisteína; hidroxilasa 25 de colesterol; factor de transcripción relacionado con enanismo 3; receptor de interleucina 11, alfa; pro-colágeno se-impulsador de endopeptidasas; homólogo ensortijado 7 (Drosophila); gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C (hexabrachion); proteína de homeobox iroquois 5; hephaestin; integrina, beta 8; glicoproteína vesículas sináptica 2; neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; proteína vinculadora del factor de crecimiento similar a la insulina 2, 20 36 kDa; Homo sapiens ADNc FLJ12280 fis, MAMMA1001744 clon; factor similar al receptor citoquina 1; los canales activados por el calcio de conducción intermedia / pequeña de potasio, subfamilia N, miembro 4; integrina, beta 7; co-activador transcripcional con motivo de vinculación PDZ-(TAZ); homólogo de homeobox oculis sine 2 (Drosophila); Proteína KIAA1034; proteína de membrana asociada con las vesículas 5 (myobrevin); proteína 25 matricial extracelular similar a la fibulina que contiene EGF 1; respuesta de crecimiento temprano 3; homeobox cercana 5; proteína hipotética FLJ20373; familia aldoceto reductasa 1, miembro C3 (3-alfa hidroxiesteroide Dehydrogenase, tipo II); biglicano; co-activador transcripcional con motivo de vinculación PDZ-(TAZ); fibronectina 1; proencefalina; integrina, similar a beta-1 (con dominios que se repiten similares a EGF); Euroimage 1968422 de ADNc del clon insertado completamente en el ARNm de Homo sapiens; EphA3; Proteína KIAA0367; receptor del péptido natriurético C / guanilato ciclasa C (receptor de péptidos atrionatriuréticos C); proteína hipotética FLJ14054; 30 ARNm de Homo sapiens; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222); BCL2 / proteína similar a la 3 que interactúa con el adenovirus E1B; proteína de vinculación AE 1; y el polipéptido VIIa de la subunidad de oxidasa de citocromo c 1 (músculo).

35 En otras realizaciones, las PPDCs podrían caracterizarse por la secreción de por lo menos uno de MCP-1, IL-6, IL-8, GCP-2, HGF, KGF, FGF, HB-EGF, BDNF, TPO, MIP1a, RANTES, y TIMP1. En cuerpos alternos, las PPDCs podrían caracterizarse por la falta de secreción de por lo menos uno de TGF-beta2, ANG2, PDGFbb, MIP1b, 1309, MDC, y VEGF, como lo detectó ELISA.

40 En realizaciones importantes, las células contienen dos o más de lo que se listo anteriormente como características de crecimiento, producción de marcadores de proteína / superficie, expresión genética o secreción de sustancias. Más preferidas son aquellas células que tienen 3, 4 o 5 o más de las características. Aún más idóneas son aquellas PPDCs que tienen 6, 7, 8 o más de estas características. Las más idóneas son las que presentan todas las características mencionadas.

45 Entre las células que actualmente son más preferidas para el uso de la invención en varios aspectos son las células de postparto que tienen las características que se acaban de describir y aún más, específicamente, aquellas células que tienen cariotipos normales y los mantienen cuando se van pasando, y aún más aquellas células que expresan cada uno de los marcadores CD10, CD 13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, y HLA-A,B,C, donde las células producen proteínas inmunológicamente detectables que corresponden a los marcadores listados, y que 50 adicionalmente a lo anterior no producen proteínas que corresponden a ninguno de los siguientes marcadores CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, o HLA-DR,DP,DQ, tal como se detecta por citometría de flujo.

55 Ciertas células al tener el potencial de diferenciarse a líneas de varios fenotipos no son estables y por lo tanto pueden diferenciarse espontáneamente. Actualmente se prefiere usar para la invención células que no se diferencian espontáneamente, por ejemplo a lo largo de las líneas neurales. Las células preferidas, cuando se cultivan en un medio de crecimiento, son sustancialmente estables en referencia a los marcadores celulares producidos en su superficie, y en referencia a la tendencia de expresión de varios genes, por ejemplo como se determina usando el Affymetrix GENECHIP (CHIP GENÉTICO). Las células se mantienen substancialmente 60 constantes, un ejemplo en sus características de marcadores de superficie cuando se están pasando, a través de múltiples doblajes de población.

65 Sin embargo, una característica de las PPDCs es que ellas podrían ser inducidas deliberadamente a diferenciarse en varios fenotipos de linaje al exponerlas a condiciones de cultivos celulares que inducen a la diferenciación. Durante su uso en el tratamiento de ciertas condiciones degenerativas oculares, las PPDCs podrían ser inducidas a diferenciarse en fenotipos neurales usando uno o más métodos conocidos en la industria. Por

ejemplo, como se muestra aquí, las PPDCs podrían ser chapadas en matraces cubiertas con laminina en un medio neurobasal-A (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contenga B27 (suplemento B27, Invitrogen), L-glutamina y penicilina/estreptomicina, combinación que se refiere aquí como medio de Expansión Progenitor Neural (NPE - Neural Progenitor Expansion). El medio NPE podría suplementarse aún más con bFGF y / o EGF. Alternativamente, las PPDCs podrían ser inducidas a diferenciarse in vitro al (1) co-cultivar las PPDCs con células progenitoras neurales, o (2) cultivar las PPDCs en un medio acondicionado con células progenitoras neurales.

La diferenciación de las PPDCs en fenotipos neurales puede demostrarse por medio de una morfología celular bipolar con procesos extendidos. Las poblaciones celulares inducidas podrían marcar positivo para la presencia de nestina. Las PPDCs diferenciadas podrían evaluarse por la detección de nestina, TuJ1 (BIII tubulina), GFAP, tirosina hidroxilasa, GABA, O4 y/o MBP. En algunas realizaciones, las PPDCs han exhibido la capacidad para formar cuerpos tridimensionales característicos de la formación de neuroesferas por parte de las células madres neuronales.

### 15 Poblaciones, modificaciones, componentes y productos celulares

La invención ofrece poblaciones de células aisladas del tejido del cordón umbilical para su uso en el tratamiento de un paciente que tiene una condición degenerativa ocular. Estas poblaciones incluyen las PPDCs descritas anteriormente. En algunas realizaciones la población celular es heterogénea. Una población celular heterogénea de la invención puede comprender al menos alrededor del 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de PPDCs. Las poblaciones celulares heterogéneas de la invención pueden comprender células madre no embrionarias u otras células progenitoras no embrionarias, como células progenitoras epiteliales o neuronales, o puede comprender adicionalmente células completamente diferenciadas. En algunas realizaciones, la población es sustancialmente homogénea, es decir, se conforma sustancialmente de PPDCs únicamente (preferiblemente por lo menos alrededor de 96%, 97%, 98%, 99% o más PPDCs). La población celular homogénea de la invención incluye células derivadas del tejido del cordón umbilical. Se prefiere que las poblaciones homogéneas de células derivadas de tejido del cordón umbilical no contengan células de linaje materno. Las poblaciones homogéneas de células derivadas de la placenta pueden ser de linaje neonatal o materno. La homogeneidad de una población celular puede lograrse por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo clasificación celular (por ejemplo citometría de flujo) o por expansión clónica de acuerdo con métodos conocidos. Así, las poblaciones de PPDC homogéneas preferidas pueden comprender una línea celular clonal de células derivadas del postparto. Dichas poblaciones son particularmente útiles cuando se ha aislado un clon celular con funcionalidad altamente deseada.

Adicionalmente se presenta en este documento poblaciones de células incubadas en la presencia de uno o más factores, o bajo condiciones, que estimulan la diferenciación de células madres a lo largo de un sendero deseado (por ejemplo, neural, epitelial). Aquellos factores son conocidos en la industria y el técnico experimentado apreciará que aquella determinación de condiciones adecuadas para que se pueda lograr la diferenciación con experimentos rutinarios. La optimización de aquellas condiciones puede lograrse por medio de diseño y análisis experimental estadístico, por ejemplo la metodología de la respuesta de la superficie permite una optimización simultánea de múltiples variables, por ejemplo en un cultivo biológico. Actualmente los factores preferidos incluyen, pero no se limitan a, factores tales como de crecimiento o tróficos, agentes que facilitan la desmetilación, co-cultivos con células de linaje neural o epitelial o cultivos en medios acondicionados para células de linaje neural o epitelial, así como otras condiciones conocidas en la industria para estimular la diferenciación de células madres a lo largo de estos senderos (para factores útiles en la diferenciación neural, refiérase a, por ejemplo, Lang, K.J.D. et al., 2004, J. Neurosci. Res. 76: 184-192; Johe, K.K. et al., 1996, Genes Devel. 10: 3129-3140; Gottleib, D., 2002, Ann. Rev. Neurosci. 25: 381-407).

Las células de postparto, preferiblemente PPDCs, también pueden ser modificadas genéticamente para producir productos genéticos terapéuticamente útiles, o para que produzcan agentes antineoplásicos para el tratamiento de tumores, por ejemplo. Las modificaciones genéticas pueden ser logradas usando una variedad de vectores incluyendo, pero sin limitarse a, vectores integrales virales, por ejemplo, vector del retrovirus o vectores virales adenoasociados; vectores replicativos no integradores, por ejemplo, vectores del virus papiloma, vectores SV40, vectores adenovirales; o vectores virales de replicación defectiva. Otros métodos para introducir ADN en las células incluyen el uso de liposomas, electroporación, una pistola de partículas, o por inyección directa de ADN.

Las células huésped son preferiblemente transformadas o transfectadas con ADN controlado por, o en asociación operativa con, uno o más elementos apropiados de control de expresión tales como secuencias promotoras o impulsadoras, terminadores transcripcionales, lugares de poliadenilación, entre otras, y un marcador seleccionable. Cualquier promotor puede ser utilizado para dirigir la expresión del gen insertado, por ejemplo, los promotores virales incluyen, pero no se limitan a, promotor / impulsador CMV, SV 40, virus del papiloma, virus Epstein-Barr o promotor genético de elastina. En algunas realizaciones, los elementos de control usados para manejar la expresión del gen de interés pueden permitir a la expresión regulada del gen para que el producto sea sintetizado sólo cuando se necesite hacerlo in vivo. Si se desea una expresión transitoria, se usarán preferiblemente promotores constitutivos en vectores no integradores y / o de replicación defectiva. Alternativamente, promotores

inducibles podrían utilizarse para manejar la expresión del gen insertado cuando sea necesario. Los promotores inducibles incluyen, pero no se limitan a, aquellos asociados con las proteínas metalotioneína y de golpe de calor.

Después de la introducción del ADN foráneo, podría permitirse el crecimiento de células diseñadas en un medio de crecimiento enriquecido y cambiado posteriormente a un medio selectivo. El marcador seleccionables en el ADN foráneo otorga resistencia a la selección y permite que las células integren establemente el ADN foráneo como, por ejemplo, en un plásmido, a sus cromosomas y crecen en forma de focos que, a cambio, puede ser clonados y expandidos en líneas celulares. Este método puede ser usado ventajosamente para diseñar líneas celulares que expresan el producto genético.

Las células pueden ser diseñadas genéticamente para "noquear" o "tumbar" factores de expresión que promueven inflamación o rechazo en el lugar del implante. Técnicas regulatorias negativas para la reducción de niveles de expresión genética objetiva o niveles de actividad del producto genético objetivo tal como se menciona a continuación. "Regulación negativa", como se menciona aquí, se refiere a una reducción en el nivel y / o actividad del producto genético objetivo en la ausencia del tratamiento regulatorio. La expresión de un gen nativo a una célula neuronal o glial puede ser reducida o noqueada usando varias técnicas incluyendo, por ejemplo, la inhibición de la expresión al desactivar el gen usando la técnica de recombinación homóloga. Típicamente, un exón que codifica una región importante de la proteína (o un exón 5' a esa región) se interrumpe por un marcador positivo seleccionable, por ejemplo, neo, previniendo la producción de ARNm normal del gen objetivo y resultando en la desactivación de ese gen. Un gen también puede ser desactivado al crear una eliminación en una parte del gen, o al borrar totalmente el gen. Al usar un armazón con las dos regiones de la homología al gen objetivo que están alejadas en el genoma, las secuencias que intervienen en las dos regiones pueden ser borradas (Mombaerts et al., 1991, Proc. Nat. Acad. Sci. Estados Unidos 88:3084). Anti - sentido, enzimas ADN, ribozimas, pequeños ARN que interfiere (siARN - small interfering RNA) y otras moléculas similares que inhiben la expresión del gen objetivo también pueden ser usados para reducir el nivel de la actividad del gen objetivo. Por ejemplo, moléculas ARN anti - sentido que inhiben la expresión de complejos genéticos importantes de histocompatibilidad (HLA - histocompatibility gene complexes) han demostrado ser los más versátiles en relación a respuestas inmunológicas. Adicionalmente, moléculas de triple hélice pueden ser utilizadas para reducir el nivel de actividad genética objetiva. Estas técnicas están descritas detalladamente por L.G. Davis et al. (eds), 1994, BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (MÉTODOS BÁSICOS EN BIOLOGÍA MOLECULAR), 2da ed., Appleton & Lange, Norwalk, CN.

En otros aspectos, la divulgación suministra lisados celulares y fracciones celulares solubles preparadas de células madre de postparto, preferiblemente PPDCs, o poblaciones celulares heterogéneas u homogéneas que contienen PPDCs, así como PPDCs o sus poblaciones que han sido modificadas genéticamente o que han sido estimuladas para diferenciarse a lo largo de un sendero neuro - genético. Aquellos lisados y sus fracciones tienen muchos usos. El uso de fracciones de lisados celulares solubles (en otras palabras, substancialmente libres de membranas) in vivo, por ejemplo, permiten al entorno intracelular beneficioso a ser usado alogénicamente en un paciente sin introducir una cantidad considerable de proteínas celulares superficiales que muy posiblemente activarían un rechazo, u otras respuestas inmunológicamente adversas. Los métodos para lisar células son bien conocidos en la industria e incluyen varias formas de una mecánica, ruptura enzimática o ruptura química, o una combinación de ellas. Aquellos lisados pueden prepararse directamente de células en su medio de crecimiento y por lo tanto contendrían factores de crecimiento secretados y similares, o podrían ser preparadas de células que fueron lavadas de un medio en, por ejemplo, PBS u otra solución. Las células lavadas pueden ser re - suspendidas en concentraciones mayores que la densidad poblacional original si se desease.

En una realización de la divulgación, se preparan lisados completos, por ejemplo, al separar las células sin su separación subsiguiente de las fracciones celulares. En otra realización, una fracción de membrana celular se separa de una fracción soluble de las células por métodos rutinarios conocidos en la industria, por ejemplo, centrifugación, filtración, o métodos similares.

En algunas realizaciones de la divulgación, se menciona que lisados celulares o fracciones celulares solubles preparadas de células derivadas de postparto podrían ser utilizadas en su forma natural, o altamente concentradas, por medio de por ejemplo, ultrafiltración o liofilización, o incluso secas, purificadas parcialmente, combinadas con portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables conocidos en la industria, o combinados con otros componentes tales como composiciones biológicas, por ejemplo composiciones proteínicas farmacéuticamente útiles. Los lisados celulares o sus fracciones pueden ser utilizados in vitro o in vivo, por si solas o por ejemplo, con células vivas autólogas o singénicas. Los lisados, si se introducen in vivo, podrían ser introducidos localmente o en un sitio del tratamiento, o remotamente para suministrar, por ejemplo, los factores de crecimiento celular necesarios al paciente.

En otra realización de la divulgación, las células de postparto, preferiblemente PPDCs, pueden ser cultivadas in vitro para generar productos biológicos en una alta tasa. Por ejemplo, aquellas células, que producirían naturalmente un producto biológico particular de interés (por ejemplo, un factor trófico), o que hayan sido diseñadas genéticamente para producir un producto biológico, que puede ser expandido clónicamente usando las técnicas de cultivos descritas aquí. Alternativamente, las células pueden ser expandidas en un medio que induce diferenciación a un linaje deseado. En cualquier caso, los productos biológicos generados por la célula y secretados al medio

pueden ser aislados fácilmente del medio acondicionado usando técnicas de separación estándar, por ejemplo, como la precipitación proteínica diferencial, cromatografía de intercambios de iones, cromatografía de filtración con gel, electroforesis, y HPLC, sólo para nombrar algunas. Un "biorreactor" puede ser utilizado para aprovechar el método de flujo para la alimentación, por ejemplo, un cultivo tridimensional in vitro. Esencialmente, en la medida que un medio fresco está siendo pasado por un cultivo tridimensional, el producto biológico es lavado del cultivo y entonces puede ser aislado de la salida de materiales, como se mencionó anteriormente.

Alternativamente, un producto biológico de interés podría permanecer dentro de la célula y, por lo tanto, su recolección podría requerir que las células sean lisadas, como se describió anteriormente. El producto biológico puede entonces ser purificado usando una o más de las técnicas listadas anteriormente.

En otras realizaciones, la divulgación describe medios acondicionados de las células cultivadas de postparto, preferiblemente PPDCs, para usarse in vitro e in vivo como se describe a continuación. El uso de un medio acondicionado como el que se acabó de mencionar permite que los factores tróficos beneficiosos secretados por las células de postparto puede hacer usados a lo génica mente en un paciente sin introducir células intactas que pudiesen activar rechazos, u otras respuestas inmunológicamente adversas. El medio acondicionado es preparado produciendo células en un medio de cultivo, removiendo las células entonces del medio.

De acuerdo a la divulgación, medios acondicionados preparados de poblaciones de células derivadas de postparto pueden ser usadas en su forma natural, o concentradas, por ejemplo, por medio de ultrafiltración o liofilización, o hasta secadas, o parcialmente purificadas, combinadas con portadores farmacéuticamente aceptables o diluyentes conocidos en la industria, o combinadas con otros componentes como composiciones biológicas, por ejemplo composiciones proteínicas farmacéuticamente útiles. Medios acondicionados pueden ser utilizados in vitro o in vivo, solos o por ejemplo, con células vivas autólogas o singénicas. El medio acondicionado, si es introducido in vivo, puede ser introducido localmente en el lugar del tratamiento, o remotamente para suministrar, por ejemplo los factores de crecimiento celular o tróficos al paciente.

En otra realización de la divulgación, una matriz extracelular (ECM - extracellular matrix) producida al cultivar células de postparto (preferiblemente PPDCs) en sustratos líquidos, sólidos o semisólidos se prepara, se recolecta y se utiliza como una alternativa a implantar células vivas en un sujeto que necesite la reparación o el reemplazo del tejido. Las células cultivadas in vitro, en un medio de trabajo tridimensional como se describe en otras realizaciones de este documento, bajo condiciones que hagan que una cantidad deseada de ECM sea secretado al medio de trabajo. La composición y el nuevo tejido son removidos, y el ECM es procesado para darle más uso, por ejemplo, como una preparación inyectable. Para lograr esto, las células del medio de trabajo son muertas y cualquier vestigio es removido el medio de trabajo. Este proceso puede ser ejecutado en varias formas diferentes. Por ejemplo, el tejido viviente puede ser congelado abruptamente en nitrógeno líquido sin un conservador criogénico, o el tejido puede ser inmerso en agua destilada estéril para que las células estallen en respuesta a la presión osmótica.

Una vez que las células estén muertas, las membranas celulares pueden alterarse y los vestigios celulares pueden ser removidos con un tratamiento con un enjuague con un detergente suave, tal como EDTA, CHAPS o un detergente zwitteriónico. Alternativamente, el tejido debe ser digerido enzimáticamente y / o extraído con reactivos que descomponen las membranas celulares y permiten la remoción de los contenidos celulares. Ejemplos de aquellas enzimas incluyen, pero no se limitan a, hialuronidasa, Dispasas, proteasas, y nucleasas. Ejemplos de detergentes incluyen detergentes no iónicos tales como, por ejemplo, alcohol de poliéter de alquilaril (TRITON X-100), etanol de polietoxi de octilfenoxi (Rohm and Haas Filadelfia, PA), BRIJ-35, un éter lauril de polietoxietanol (Atlas Chemical Co., San Diego, CA), polisorbato 20 (TWEEN 20), un monolaurato de sorbitán polietoxietanol (Rohm and Haas), éter lauril de polietileno (Rohm and Haas); y detergentes iónicos tales como, por ejemplo, dodecil sulfato de sodio, alcoholes alifáticos superiores sulfatados, alcanos sulfonados y alkylarenes sulfonados que contienen de 7 a 22 átomos de carbono en una cadena ramificada o no ramificada.

La recaudación de la ECM puede ser logrado en varias formas, dependiendo, por ejemplo, si el nuevo tejido ha sido formado en un medio de trabajo tridimensional que es biodegradable o no biodegradable. Por ejemplo, si el medio de trabajo no es biodegradable, la ECM puede ser removida exponiendo al medio de trabajo a sonicación, chorros de agua de alta presión, raspado mecánico, o un tratamiento ligero con detergentes o enzimas, o cualquier combinación de lo anterior.

Si el medio de trabajo es biodegradable, la ECM puede ser recolectada, por ejemplo, permitiendo que el medio de trabajo se degrade o se disuelva en una solución. Alternativamente, si el medio de trabajo biodegradable está compuesto de un material que puede ser inyectado junto con la ECM, el medio de trabajo y la ECM pueden ser procesadas en conjunto para su subsiguiente inyección. Alternativamente, el ECM puede ser removido del medio de trabajo biodegradable por medio de cualquier método descrito anteriormente para la recaudación de la ECM de un medio de trabajo que no sea biodegradable. Todos los procesos de recolección son diseñados preferiblemente para no desnaturalizar la ECM.

Después de que ha sido recolectada, la ECM puede ser procesada aún más. Por ejemplo, la ECM puede ser homogeneizada a pequeñas partículas usando técnicas bien conocidas en la industria tales como sonicación, para que puedan pasar por medio de una aguja quirúrgica. Los componentes de la ECM pueden ser vinculados transversalmente, si se desease, por irradiación gamma. Preferiblemente, la ECM puede ser irradiada entre 0.25 a 2 mega rads para esterilizar y vincular transversalmente la ECM. Vincular transversalmente con químicos usando agentes que son tóxicos, tales como el Glutaraldehído, es posible pero no es generalmente recomendable.

Las cantidades y / o tasas de proteínas, tales como los varios tipos de colágeno que están presentes en la ECM, pueden ser ajustados al mezclar la ECM producida por las células de la invención con uno o más tipos de células adicionales. Además, sustancias biológicamente activas tales como las proteínas, factores de crecimiento y / o fármacos, pueden ser incorporadas a la ECM. Ejemplos de sustancias biológicamente activas incluyen factores de crecimiento de tejidos, tales como TGF-beta, y similares, que promueven la salvación y reparación de tejidos en el lugar de la inyección. Aquellos agentes adicionales pueden ser utilizados en cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente, por ejemplo, con lisados celulares completos, fracciones celulares solubles, o componentes purificados y productos producidos por las células.

### Composiciones farmacéuticas

En otra realización, la invención suministra composiciones farmacéuticas que utilizan células de postparto, preferiblemente PPDCs, poblaciones celulares y componentes celulares, productos en varios métodos para tratamiento de condiciones oculares degenerativas. Ciertas realizaciones cubren composiciones farmacéuticas que se componen de células vivas (por ejemplo, PPDCs solas o agregadas y mezcladas con otros tipos de células). Otras realizaciones de la divulgación cubren composiciones farmacéuticas que contienen componentes celulares PPDC (por ejemplo, lisados celulares, fracciones celulares solubles, medios acondicionados, ECM, o componentes de cualquiera de lo que se acaba de mencionar) o productos (por ejemplo, factores tróficos y otros factores biológicos producidos naturalmente por las PPDCs o por medio de modificación genética, medios acondicionados de cultivos PPDC). De cualquier forma, la composición farmacéutica puede incluir otros agentes activos, tales como agentes anti - inflamatorios, agentes anti - apópticos, antioxidantes, factores de crecimiento, factores neuro - tróficos o neuro - regenerativos, neuro regeneradoras o fármacos oftálmicos conocidos en la industria.

Ejemplos de otros componentes que pueden ser agregados a composiciones farmacéuticas PPDCs incluyen, pero no se limitan a: (1) otros fármacos neuro protectores o neuro beneficiosos; (2) componentes seleccionados de matrices extracelulares, tal como uno o más tipos de colágeno conocidos en la industria, y/o factores de crecimiento, plasma rica en plaquetas, y fármacos (Alternativamente, las PPDCs pueden ser diseñadas genéticamente para expresar y producir factores de crecimiento); (3) agentes anti - apópticos (por ejemplo, eritropoyetina (EPO), mimeticuerpo, trombopoyetina, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) -I, IGF-II, factor de crecimiento de hepatocitos, inhibidores de caspasas); (4) compuestos anti-inflamatorios (por ejemplo, los inhibidores de quinasa de p38 MAP, inhibidores de TGF-beta, estatinas, inhibidores de IL-6 e IL-1, PEMIROLAST, TRANILAST, REMICADE, SIROLIMUS, y medicamentos anti-inflamatorios no esteroideos (AINES) (tales como TEPOXALINA, TOLMETINA, y SUPROFENO); (5) agentes inmunosupresores o inmunomoduladores, tales como inhibidores de la calcineurina, inhibidores de mTOR, antiproliferativas, corticosteroides y varios anticuerpos; (6) antioxidantes tales como probucol, vitaminas C y E, coenzyma Q- 10, glutatión, L-cisteína y N-acetilcisteína; y (6) anestésicos locales, por nombrar algunos.

Las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen células de postparto (preferiblemente PPDCs) o sus componentes o sus productos, formulados con un portador o medio farmacéuticamente aceptable que podría incluir agua, solución salina (tal como la solución de Ringer), alcoholes, aceites, gelatinas y carbohidratos, tales como la lactosa, amilosa, o almidón, ésteres de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa y polivinilpirrolidona aquellas preparaciones pueden ser esterilizadas, si se desease, mezcladas con agentes auxiliares tales como lubricantes, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, emulsiones, sales que influyen la presión osmótica, amortiguadores, y colorantes. Típicamente, pero no exclusivamente, las composiciones farmacéuticas que incluyen componentes o productos celulares, pero no células vivas, se formulan como líquidos. Las composiciones farmacéuticas que incluyen células vivas PPDC son formuladas típicamente como líquidos, semisólidos (por ejemplo, geles) o sólidos (por ejemplo, matrices, supercántigos y similares, tal como sea apropiado para la ingeniería de tejidos oftálmicos).

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir componentes auxiliares que resultarían familiares a los químicos o biólogos medicinales. Por ejemplo, podrían mantener antioxidantes en rangos que varían dependiendo del tipo de oxidante que se use. Rangos razonables para antioxidantes comúnmente usados son de alrededor de 0.01% hasta alrededor de 0.15 por ciento (masa sobre volumen) de EDTA alrededor de 0.0 1% hasta alrededor de él 2.0 por ciento de (masa sobre volumen) de sodio sulfito, y alrededor de 0.0 1% hasta alrededor de 2.0 por ciento (masa sobre volumen) de Disulfito de sodio. Un técnico con experiencia podría usar una presión de alrededor de 0.1 por ciento (masa sobre volumen) por cada uno de los elementos que se acaban de mencionar. Otros compuestos representativos incluyen glicina mercaptopropionil, N-acetil cisteína, beta-mercaptoetilamina, glutatión y especies similares, aunque también podrían emplearse otros agentes antioxidantes adecuados para la administración ocular, por ejemplo, ácido ascórbico y sus sales o sulfitos o metabisulfito de sodio.

Un agente amortiguador que puede ser usado para mantener el pH de las formulaciones de gotas en el ojo en el rango de alrededor 4.0 - 8.0, para minimizar la irritación del ojo. Para inyecciones intravítreas o intraoculares directas, las formulaciones deben tener un pH de 7.2 a 7.5, preferiblemente un pH de 7.3 - 7.4. Las composiciones oftalmológicas también podrían incluir agentes de tonicidad para su administración al ojo. Entre aquellas apropiadas están cloruro de sodio para hacer formulaciones aproximadamente isotónicas con 0.9 por ciento de solución salina.

En ciertas realizaciones, se formulan composiciones farmacéuticas con agentes que mejoran la viscosidad. Ejemplos de agentes son hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa, y polivinilpirrolidona. Las composiciones farmacéuticas podrían tener cosolventes añadidos si fuese necesario. Cosolventes apropiados podrían incluir glicerina, polietilenglicol (PEG), polisorbato, propilenglicol, y alcohol de polivinilo. También se pueden incluir conservantes, por ejemplo, Cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, clorobutanol, acetato o nitrato fenilmercúrico, timerosal o metilo o propilparabenos.

Las formulaciones para inyecciones son diseñadas preferiblemente para una sola administración y no contienen conservantes. Las soluciones inyectables deben tener una isotonicidad equivalente al 0.9 % de solución de cloruro de sodio (osmolalidad de 290 - 300 miliosmoles). Esto puede lograrse al agregar cloruro de sodio u otros co - solventes que se acaban de listar, o excipientes tales como agentes amortiguadores y antioxidantes, como se lista anteriormente.

Los tejidos de la cámara anterior del ojo son bañados por el humor acuoso, mientras la retina se encuentra bajo continua exposición al vítreo. Estos fluidos / geles existen en estado alto de reducción de oxidación por que contienen componentes antioxidantes y enzimas. Por lo tanto, podría ser ventajoso el incluir un agente reductor en las composiciones oftalmológicas. Agentes reductores apropiados incluyen N-acetilcisteína, ácido ascórbico o un tipo de sal, y sulfito o metabisulfito de sodio, con ácido ascórbico y / o N-acetilcisteína o glutatión que es particularmente adecuado para soluciones inyectables.

Las composiciones farmacéuticas que se conforman de células, componentes celulares o productos celulares pueden ser entregadas al ojo de un paciente por medio de una o varias modalidades conocidas en la industria. En una realización que podría ser guiada para su uso en algunas instancias, las composiciones son entregadas tópicamente al ojo en gotas o en lavados. En otra realización, las composiciones podrían ser entregadas a varias ubicaciones dentro del ojo por medio de una inyección intraocular periódica o por infusión en una solución de irrigación tal como BSS o BSS PLUS (Alcon USA, Fort Worth, TX). Alternativamente, las composiciones podrían aplicarse en otras formas de dosis oftalmológicas conocidas por técnicos con experiencia, tales como geles o liposomas formados previamente o en ese lugar, por ejemplo como se presenta en la patente de Estados Unidos 5,718,922 de Herrero-Vanrell. En otra realización, la composición puede ser entregada a o a través del lente de un ojo que necesite el tratamiento por medio de un lente de contacto (por ejemplo, Lidofilcon B, Bausch & Lomb CW79 o DELTACON (Deltafilcon A) u otro objeto que resida temporalmente en la superficie del ojo. En otras realizaciones, apoyos tales como un escudo corneal de colágeno (por ejemplo escudos cordiales disponibles de BIO-COR, Summit Technology, Watertown, Mass.) pueden implementarse. Las composiciones también pueden ser administradas por infusión al globo ocular, ya sea por medio de una cánula de una bomba osmótica (ALZET, Alza Corp., Palo Alto, Calif.) o por la implementación de cápsulas emisoras por tiempo (OCCUSENT) o discos biodegradables (OCULEX, OCUSERT). Estas rutas de administración tienen la ventaja de suministrar continuamente la composición farmacéutica al ojo. Esto puede ser una ventaja para una entrega local a la córnea, por ejemplo.

Las composiciones farmacéuticas que contienen células vivas en un portador semisólido o sólido son formuladas típicamente para su implantación quirúrgica en el lugar del daño o trastorno ocular. Sería apreciado que composiciones líquidas también puedan administrarse por procedimientos quirúrgicos. En realizaciones específicas, las composiciones farmacéuticas semisólidas o sólidas pueden incluir geles, redes, supercántigos celulares semi permeables y similares, que podrían ser no biodegradables o biodegradables. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, podría ser conveniente o apropiado el aislar células exógenas de sus alrededores, pero al mismo tiempo permitir que las células secreten y entreguen moléculas biológicas a las células de sus alrededores. En estas realizaciones, las células podrían formularse como implantes autónomos que incluyen PPDCs o poblaciones celulares que contengan PPDCs rodeadas por una barrera no degradable, específicamente permeable que separa físicamente a las células trasplantadas del tejido huésped. Tales implantes son referidos a veces como "inmuno - protectores" puesto que tienen la capacidad de evitar que células y moléculas inmunológicas maten a las células trasplantadas en la ausencia de una inmunosupresión inducida farmacológicamente (para revisar aquellos dispositivos y métodos, refiérase, por ejemplo, a ., P.A. Tresco et al., 2000, Adv. Drug Delivery (Entrega de Fármacos) Rev. 42: 3-27).

En otras realizaciones, diferentes variedades de geles y redes degradables son utilizadas para las composiciones farmacéuticas de la invención. Por ejemplo, materiales degradables particularmente aptos guiados para la liberación sostenida incluyen polímeros biocompatibles, tales como el poli (ácido láctico), poli (ácido glicólico - co - láctico), metilcelulosa, ácido hialurónico, colágeno, y similares. La estructura, selección y uso de polímeros degradables en los medios de entregas de fármacos han sido revisados en algunas publicaciones, incluyendo, A. Domb et al., 1992, Polymers for Advanced Technologies (Polímeros para Tecnologías Avanzadas) 3:279. Patente de Estados Unidos 5,869,079 de Wong et al. presenta combinaciones de entes hidrofílico sus hidrofóbicos en una

liberación sostenida biodegradable de implantes oculares. Adicionalmente, la patente de Estados Unidos 6,375,972 de Guo et al., la patente de Estados Unidos 5,902,598 de Chen et al., la patente de Estados Unidos 6,331,313 de Wong et al., la patente de Estados Unidos 5,707,643 de Ogura et al., la patente de Estados Unidos 5,466,233 de Weiner et al. y la patente de Estados Unidos 6,251,090 de Avery et al. cada una describe dispositivos y sistemas de implantes oculares que pueden ser utilizados para entregar composiciones farmacéuticas.

En otras realizaciones, por ejemplo, para la reparación de lesiones neurales, tales como un nervio óptico dañado o roto, podría ser deseable o apropiado el entregar las células en un supercántigo o matriz biodegradable, preferiblemente bio - reabsorbible o bio - absorbible. Estos bio - materiales típicamente tridimensionales contienen las células vivas adheridas al supercántigo, dispersas dentro del supercántigo, o incorporadas en una matriz extracelular atrapada en el supercántigo. Una vez implantadas en la región objetiva del cuerpo, estos implantes se integran con el tejido huésped, donde las células trasplantadas se establecen gradualmente (referirse a, por ejemplo, P.A. Tresco et al., 2000, supra; refiérase también a D.W. Huttmacher, 2001, J. Biomater. Sci. Polymer Edn. 12: 107-174).

Ejemplos de materiales para supercántigos o matrices (a veces referidos colectivamente como "medios de trabajo") que podrían ser utilizados en esta invención incluyen esteras no tejidas, espumas porosas o péptidos auto ensamblables. Los esteros no tejidos pueden, por ejemplo, formarse usando fibras de con polímero absorbible sintético de ácidos glicólico y láctico (PGA/PLA), vendidos bajo la marca VICRYL (Ethicon, Inc., Somerville, NJ), espumas compuestas de, por ejemplo, co - polímero poli (Caprolactona épsilon) / poli (ácido glicólico) (PCL/PGA), formado por procedimientos tales como congelación - secado, o liofilización, como se cubrió en la patente de Estados Unidos número 6,355,699, también podrían utilizarse. Hidrogel es tales como péptidos auto ensamblables (por ejemplo, RAD16) también pueden ser utilizados. Redes degradables que se forman en el lugar de la aplicación también son apropiados para su uso en la invención (referirse, por ejemplo, a Anseth, K.S. et al., 2002, J. Controlled Release (Emisión Controlada) 78: 199 - 209; Wang, D. et al., 2003, Biomaterials (Bio - Materiales) 24: 3969-3980; publicación de la patente de Estados Unidos 2002/0022676 de He et al.). Estos materiales se formulan como fluidos apropiados para su inyección, y pueden ser inducidos en una variedad de formas (por ejemplo, cambios de temperatura, pH, exposición a la luz) para formar redes de hidrogel degradable in situ o in vivo.

En otra realización, el medio de trabajo es un fieltro, que puede ser compuesto de un hilo hecho de material bio - absorbible, por ejemplo, co - polímeros o mezclas PGA, PLA, PCL o ácido hialurónico. El hilo se convierte en un fieltro usando técnicas estándares de procesamiento textil que consisten en prensar, cortar, cardar y tejer. En otra realización, las células son sembradas en supercántigos de espuma que pueden ser estructuras compuestas.

En muchas de las realizaciones que se acaban de mencionar, el medio de trabajo puede ser moldeado en una forma útil. Es más, sería apreciado que las PPDCs pudiesen cultivarse en dispositivos quirúrgicos o implantables pre - formados, no degradables, por ejemplo, en una forma que corresponda a aquella usada para la preparación de rollos endovasculares GDC que contengan fibroblastos, por ejemplo (Marx, W.F. et al., 2001, Am. J. Neuroradiol. 22: 323 - 333).

La matriz, supercántigo o dispositivo puede ser tratado antes de la inoculación de células para mejorar la adherencia de las mismas. Por ejemplo, antes de la inoculación, matrices de nylon podrían ser tratadas con 0.1 mol de ácido acético e incubadas en PBS polilisina, y/o colágeno para cubrir el nylon. Poliestireno puede ser tratado similarmente usando ácido sulfúrico. Las superficies externas de un medio de trabajo también pueden ser modificadas para mejorar la adherencia o el crecimiento de las células y la diferenciación del tejido tales como la cobertura de plasma en el medio de trabajo o la adición de una o más proteínas (por ejemplo, colágenos, fibras elásticas, fibras reticulares), glicoproteínas, glucosaminoglicanos (por ejemplo, sulfato de heparina, sulfato- 4 - de condroitina, sulfato- 6 - de condroitina, sulfato de dermatán, sulfato de queratina), una matriz celular, y / u otros materiales tales como, pero sin limitarse a, gelatina, anginatos, agar, agarosa, gomas vegetales, entre otras.

Los medios de trabajo que contienen células vivas se preparan de acuerdo a los métodos conocidos en la industria. Por ejemplo, las células pueden ser cultivadas libremente en un frasco de cultivos para alcanzar la sub - confluencia o confluencia, extraídas del cultivo e inoculadas en el medio de trabajo. Se pueden agregar factores de crecimiento al medio de cultivo antes, durante, o después de la inoculación de las células para activar su diferenciación y formación del tejido, si se desease. Alternativamente, los medios de trabajo en si pueden ser modificados para que sus células de crecimiento se mejoren, o para que el riesgo de rechazo del implante se ha reducido. Por lo tanto, uno o más componentes biológicamente activos, incluyendo, pero sin limitarse a, factores anti inflamatorios, inmunosupresores o de crecimiento, podrían agregarse al medio de trabajo para una emisión local.

## Métodos de Utilización

Las células derivadas del tejido del cordón umbilical humano, o poblaciones celulares, y de acuerdo a la divulgación, componentes de o productos producidos por aquellas células, pueden ser utilizadas en una variedad de formas para dar apoyo y facilitar la reparación y regeneración de células y tejidos oculares. Aquellos usos cubren métodos in vitro, ex vivo e in vivo.

**Métodos in vitro y ex vivo:**

5 En una realización de la divulgación, las PPDCs pueden ser utilizadas in vitro para examinar una amplia  
 variedad de componentes para detectar su efectividad y citotoxicidad de agentes farmacéuticos, factores de  
 crecimiento, factores regulatorios, y similares. Por ejemplo, aquella examinación podría ser realizada en poblaciones  
 sustancialmente homogéneas de PPDCs para evaluar la eficacia o la toxicidad de componentes candidatos a ser  
 formulados con, o co - administrados con, las PPDCs para el tratamiento de una condición ocular. Alternativamente,  
 10 aquella examinación puede ser realizada en las PPDCs que han sido estimuladas para diferenciarse en un tipo de  
 células que se encuentra en el ojo, o sus progenitoras, con el fin de evaluar la eficacia de los nuevos candidatos de  
 fármacos farmacéuticos. En esta realización, las PPDCs se mantienen in vitro y expuestas al componente a ser  
 probado. La actividad de un componente potencialmente citotóxico puede ser medida por su habilidad de dañar o  
 matar a las células en el cultivo. Esto podría evaluarse fácilmente de con técnicas de marcación vitales. El efecto de  
 15 los factores de crecimiento o regulatorios puede ser evaluado al analizar el número o robustez de las células  
 cultivadas, cuando se las compara con células que no han sido expuestas a los factores. Esto podría lograrse  
 usando técnicas citológicas y / o histológicas estándar, incluyendo el uso de técnicas inmunocitoquímicas utilizando  
 anticuerpos que definen antígenos celulares de un tipo específico.

20 En otra realización, como se menciona anteriormente, las PPDCs pueden ser cultivadas in vitro para  
 generar productos biológicos que son generados naturalmente por las células, o producidos por las células cuando  
 se inducen a su diferenciación en otros linajes, o generados por las células por medio de modificación genética. Por  
 ejemplo, se descubrió que TIMP1, TPO, KGF, HGF, FGF, HBEGF, BDNF, MIP1b, MCP1, RANTES, 1309, TARC,  
 MDC, e IL-8 fueron secretadas de las células derivadas del tejido del cordón umbilical que fueron cultivadas en un  
 medio de crecimiento. Se descubrió que TIMP1, TPO, KGF, HGF, HBEGF, BDNF, MIP1a, MCP-1, RANTES, TARC,  
 25 Eotaxina, e IL-8 fueron secretadas de las PPDCs derivadas de la placenta en medio de crecimiento (referirse a los  
 ejemplos). Algunos de estos factores tróficos, tales como BDNF e IL-6, tienen roles importantes en la regeneración  
 neural. Otros factores tróficos, que todavía no han sido detectados o examinados, para su uso en reparación o  
 regeneración de tejidos oculares, es muy posible que sean producidos por PPDCs y posiblemente sean secretados  
 al medio.

30 En este aspecto, otra realización de la divulgación destaca a PPDCs para la producción de medios  
 acondicionados, ya sea de PPDCs no diferenciados o de PPDCs incubados bajo condiciones que estimulan la  
 diferenciación. Tales medios acondicionados se contemplan para su uso en cultivos in vitro o ex vivo de células  
 precursoras epiteliales o neurales, por ejemplo, o in vivo para dar apoyo a células trasplantadas conformadas de  
 35 poblaciones homogéneas de PPDCs o poblaciones heterogéneas conformadas de PPDCs y otros progenitores, por  
 ejemplo.

40 Una realización de la divulgación incluye el uso de lisados de células PPCD, fracciones celulares solubles o  
 sus componentes, o ECM o sus componentes, para una variedad de propósitos. Como se menciona anteriormente,  
 algunos de estos componentes pueden ser usados en composiciones farmacéuticas. En otras realizaciones, un  
 lisado celular o un ECM se utiliza para cubrir o tratar de otra forma sustancias o dispositivos a ser usados  
 quirúrgicamente, o para su implantación, o para propósitos ex vivo, o para promover la diferenciación o  
 supervivencia de células o tejidos contactados en el curso de esos tratamientos.

45 Como se describe en los ejemplos 13 y 15, las PPDCs demostraron la habilidad de apoyar la sobrevivencia,  
 crecimiento y diferenciación de células progenitoras neurales adultas cuando se las produce en co - cultivos con  
 aquellas células. Asimismo, los resultados experimentales establecidos en el ejemplo 18 indican que las PPDCs  
 pueden funcionar para dar apoyo a células de la retina por medio de mecanismos tróficos. De esa misma forma, en  
 otra realización, las PPDCs son utilizadas ventajosamente en co - cultivos in vitro para suministrar soporte trófico a  
 50 otras células, en particular a células neurales y progenitoras neurales y oculares (por ejemplo, células madre  
 neurales y células madre epiteliales de la retina o de la córnea). Para co - cultivos, podría desearse que las PPDCs y  
 otras células deseadas sean co - cultivadas bajo condiciones en las cuales los dos tipos de células estén en  
 contacto. Esto puede lograrse, por ejemplo, al sembrar las células como poblaciones heterogéneas de células en  
 medios de cultivo o en un sub estrato de cultivos adecuado. Alternativamente, las PPDCs pueden producirse para  
 55 entrar en confluencia, y entonces servir como un sub estrato del segundo tipo de células deseado en el cultivo. En  
 esta realización reciente, las células pueden ser separadas aún más físicamente, por ejemplo, por una membrana o  
 un dispositivo similar, de tal forma que el otro tipo de célula pueda ser removido y usado separadamente, después  
 del período de co -cultivo. El uso de las PPDCs en co - cultivo para promover la expansión y diferenciación de tipos  
 de células neurales u oculares podría encontrar aplicabilidad en las áreas de investigación y clínicas / terapéuticas.  
 60 Por ejemplo, co - cultivos PPDC pueden ser utilizados para facilitar el crecimiento y la diferenciación de aquellas  
 células en el cultivo, para propósitos básicos de investigación o para el uso de ensayos para la examinación de  
 fármacos, por ejemplo. Co - cultivos PPDC pueden ser usados también para la expansión ex vivo de progenitores  
 neurales u oculares para su administración posterior para propósitos terapéuticos. Por ejemplo, células progenitoras  
 neurales u oculares podrían ser cosechadas de un individuo, expandidas ex vivo en un co - cultivo con PPDCs, y  
 65 entonces regresadas al individuo (transferencia autóloga) u otro individuo (transferencia singénica o alogénica). En  
 estas realizaciones, sería apreciado que, después de la expansión ex vivo, la población mixta de células que

contienen las PPDCs y los progenitores pudiesen administrarse a un paciente que necesite el tratamiento. Alternativamente, en situaciones donde una transferencia autóloga es apropiada o deseable, las poblaciones celulares co - cultivadas pueden ser separadas físicamente en el cultivo, permitiendo la remoción de los progenitores autólogos para su administración al paciente.

5

**Métodos in vivo:**

Como se establece en los ejemplos 16, 17 y 18, las PPDC han demostrado poder trasplantarse efectivamente en el cuerpo, para suministrar funciones neurales o de la retina perdidas en modelos animales aceptados por su similitud de eficacia en humanos. Estos resultados dan soporte a una realización importante de la invención, donde las PPDCs son utilizadas en terapia celular para tratar condiciones oculares degenerativas. Una vez que se ha trasplantado a la ubicación vivo en el ojo, las PPDCs pueden diferenciarse así mismas en uno o más fenotipos, o pueden suministrar soporte trófico a células oculares in situ, o pueden ejercer un efecto beneficioso en ambas formas, entre otras.

15

Las PPDCs pueden administrarse solas (por ejemplo, como poblaciones sustancialmente homogéneas) o como mezclas con otras células. Como se acaba de describir, las PPDCs pueden ser administradas en una manera formulada en una preparación farmacéutica con una matriz o un supercántigo, o con portadores convencionales farmacéuticamente aceptables. En los casos en los que las PPDCs son administradas con otras células, estas pueden ser administradas simultáneamente o secuencialmente con las otras células (ya sea antes o después de las otras células). Las células que pueden ser administradas en conjunto con PPDCs incluyen, pero no se limitan a, neuronas, astrocitos, oligodendrocitos, células progenitoras neurales, células madre neurales, células progenitoras oculares, células madre epiteliales de la retina o de la córnea y / u otras células madre multipotentes. Las células de diferentes tipos pueden ser mezcladas con las PPDCs inmediatamente o un poco después de su administración, o pueden ser co - cultivadas juntas por un período de tiempo antes de su administración.

25

Las PPDCs pueden ser administradas con otros fármacos, moléculas biológicas beneficiosas, tales como factores de crecimiento, factores tróficos, medios acondicionados (de cultivos de células de postparto o progenitoras o diferenciadas), u otros reactivos, tales como agentes anti inflamatorios, agentes anti apópticos, antioxidantes, factores de crecimiento, factores neuro - tróficos, o fármacos neuro - regenerativos o neuro - protectores conocidos en la industria. Cuando las PPDCs son administradas con otros agentes, pueden ser administradas juntas o en una composición farmacéutica individual, o en composiciones farmacéuticas separadas, simultáneamente o secuencialmente con otros agentes (ya sea antes o después de la administración de los otros agentes).

30

Ejemplos de otros componentes que pueden ser administrados con células de postparto incluyen, pero no se limitan a: (1) otros fármacos neuro - protectores o neuro - beneficiosos; (2) componentes seleccionados de matrices extracelulares, como uno o más tipos de colágeno conocidos en la industria, y / o factores de crecimiento, plasma rico en plaquetas, y fármacos (Alternativamente, las células pueden ser diseñadas genéticamente para expresar y producir factores de crecimiento); (3) agentes anti - apópticos (por ejemplo, eritropoyetina (EPO), EPO mimético, trombopoyetina, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) -I, IGF-II, factor de crecimiento de hepatocitos, inhibidores de caspasas); (4) compuestos anti-inflamatorios (por ejemplo, los inhibidores quinasa p38 MAP, inhibidores de TGF-beta, estatinas, inhibidores de IL-6 e IL-1, PEMIROLAST, TRANILAST, REMICADE, sirolimus, y medicamentos anti-inflamatorios no esteroideos (AINES) (tales como TEPOXALINA, TOLMETINA, y SUPROFENO); (5) agentes inmunosupresores o inmuno - moduladores, tales como inhibidores de la calcineurina, inhibidores de mTOR, anti - proliferativos, corticosteroides y varios anticuerpos; (6) antioxidantes tales como probucol, vitaminas C y E, conenzyme Q-10, glutatión, L-cisteína y N-acetilcisteína; y (6) anestésicos locales, sólo para nombrar algunas.

35

40

45

En una realización, las PPDCs son administradas como células no diferenciadas, por ejemplo, como cultivadas en un medio de crecimiento. Alternativamente, las PPDCs pueden ser administradas después de su exposición en cultivos con condiciones que estimulan la diferenciación hacia un fenotipo deseado.

50

Las células pueden ser implantadas quirúrgicamente, injertadas o administradas de otra forma directamente o indirectamente al lugar del daño o trastorno ocular. Cuando las células son administradas en dispositivos semisólidos o sólidos, comúnmente es adecuada una implantación quirúrgica en una ubicación precisa del cuerpo como medio de administración. Sin embargo, composiciones farmacéuticas líquidas o fluidas pueden ser administradas a una ubicación más general en el ojo (por ejemplo, superficialmente o intraocularmente).

55

Otras realizaciones de la divulgación cubren métodos de tratamientos de condiciones degenerativas oculares administrando composiciones farmacéuticas que contienen componentes (por ejemplo lisados celulares o sus componentes) o productos (por ejemplo, factores tróficos y otros factores biológicos celulares que son producidos naturalmente por PPDCs o por medio de una modificación genética, medio acondicionado de un cultivo PPDC) celulares PPDC. Nuevamente, estos métodos pueden involucrar la administración de otros reactivos tales como factores de crecimiento, factores neuro - tróficos o fármacos neuro - regenerativos o neuro - protectores conocidos en la industria.

60

65

Las formas y regímenes de dosis para administrar las PPDCs o cualquiera de las otras composiciones farmacéuticas descritas aquí se desarrollan de acuerdo a la buena práctica médica, tomando en consideración la condición individual del paciente, por ejemplo, naturaleza y medida de la condición degenerativa ocular, edad, sexo, masa corporal y la condición médica general, y otros factores conocidos para los practicantes de medicina. Por lo tanto, la cantidad efectiva de una composición farmacéutica a ser administrada a un paciente se determina por estas consideraciones conocidas en la industria.

Podría ser deseable o apropiado inmuno - suprimir farmacológicamente a un paciente antes de iniciar la terapia celular. Esto puede lograrse por medio del uso sistemático de agentes inmunosupresores sistémicos o locales, o podría lograrse por medio de la entrega de las células en un dispositivo encapsulado, como se describió anteriormente. Este y otros medios para reducir o eliminar la respuesta inmunológica a las células trasplantadas son conocidos en la industria. Como una alternativa, las PPDCs pueden modificarse genéticamente para reducir su inmuno - genicidad, como se mencionó anteriormente.

La supervivencia de células trasplantadas en un paciente vivo puede determinarse por medio del uso de una variedad de técnicas de escaneo, por ejemplo, tomografía axial computarizada (CAT - computerized axial tomography o CT), imágenes de resonancia magnética (MRI - magnetic resonance imaging) o tomografía de emisión de positrones (PET - positron emission tomography). Determinar la supervivencia del trasplante puede ser hecho post mortem al remover el tejido y examinarlo visualmente o por medio de un microscopio. Alternativamente, las células pueden ser tratadas con colorantes que son específicos para células neurales u oculares o productos derivados, por ejemplo, neurotransmisores. Las células trasplantadas también pueden ser identificadas por una incorporación previa de colorantes de trazabilidad tales como micro - esferas etiquetadas con rodamina o fluoresceína, azul rápido, micro - partículas férricas, bisbenzamida o productos genéticos generadores de informes introducidos genéticamente, como el beta-galactosidasa o beta-glucuronidasa.

Una integración funcional de las células tras plan dadas en el tejido ocular de un sujeto puede ser evaluado al examinar la restauración de la función ocular que fue dañada o que se enfermó. Por ejemplo, la efectividad en el tratamiento de degeneración macular u otras retinopatías puede determinarse por la mejora de la agudeza visual y la evaluación de anomalías y la calificación de fotografías estereoscópicas del color del fondo del ojo. (Age-Related Eye Disease Study Research Group (Grupo de Investigación de Estudio de Enfermedades del Ojo relacionadas a la edad), NEI, NIH, AREDS Informe No. 8, 2001, Arch. Ophthalmol. 119: 1417-1436).

**Equipos y Bancos**

En otro aspecto, la invención suministra equipos que utilizan células de postparto, preferiblemente PPDCs, poblaciones celulares, sus componentes y productos en varios métodos para regeneración y reparación ocular como se describe anteriormente. Donde se utiliza para el tratamiento de condiciones oculares degenerativas, u otro tratamiento programado, los equipos pueden incluir una o más poblaciones celulares, incluyendo por lo menos células de postparto y un portador farmacéuticamente aceptable (líquido, semisólido o sólido). Los equipos también podrían tener opcionalmente formas de administrar las células, por ejemplo por inyección. Los equipos también podrían incluir instrucciones de uso de las células. Los equipos preparados para su uso en hospitales de campo, tales como para usos militares podrían incluir suplementos de procedimientos completos incluyendo supercántigos de tejidos, estructuras quirúrgicas, y similares, donde las células serían utilizadas en conjunto para la reparación de lesiones agudas. Equipos para métodos de ensayos e in vitro como se describe en este documento podrían contener, por ejemplo, uno o más de (1) PPDCs o componentes o productos de PPDCs, (2) reactivos para practicar el método in vitro, (3) otras células o poblaciones celulares, como sea apropiado, y (4) instrucciones para realizar el método in vitro.

En otro aspecto, la divulgación también suministra información para el almacenamiento de tejidos, células, componentes celulares y poblaciones celulares de la invención. Como se mencionó anteriormente, las células son conservadas criogénicamente fácilmente. La divulgación, por lo tanto, suministra métodos para la conservación criogénica de las células en un banco, donde las células son almacenadas congeladas y asociadas con una caracterización completa de las células basándose en obviadas inmunológicas, bioquímicas y genéticas. Las células congeladas pueden ser descongeladas y expandidas o usadas directamente para terapia autóloga, singénica o alogénica, dependiendo de los requerimientos del procedimiento y las necesidades del paciente. Preferiblemente, la información de cada muestra conservada criogénicamente es almacenada en una computadora, y se puede buscar basándose en los requerimientos del cirujano, del procedimiento y del paciente haciendo emparejamiento adecuados en la caracterización de las células o poblaciones. Preferiblemente, las células de la invención son cultivadas y expandidas a la cantidad deseada de células y las composiciones terapéuticas celulares son preparadas ya sea por separado o como co - cultivos, en la presencia o ausencia de una matriz o soporte. Aunque para algunas aplicaciones podría ser preferible el usar células preparadas frescamente, el resto podría ser conservado criogénicamente y almacenado acogerá las células e ingresar la información en la computadora para asociar los registros informáticos con las muestras. Aun cuando no fuese necesario el emparejar una fuente o donante con un recipiente de aquellas células, para propósitos inmunológicos, el sistema de almacenamiento hace fácil el emparejar, por ejemplo, propiedades deseables bioquímicas o genéticas de las células almacenadas a las necesidades terapéuticas. Después de emparejar las propiedades deseadas con una muestra almacenada, la muestra es

recuperada y preparada para su uso terapéutico. Lisados celulares, ECM o componentes celulares preparados como se describe aquí también pueden ser conservados criogénicamente o de otra forma (por ejemplo, con liofilización) y almacenados de acuerdo a esta invención.

5 Los siguientes ejemplos son suministrados para describir la invención en mayor detalle. Su intención es ilustrar, y no limitar al invención.

10 Como se utiliza en los siguientes ejemplos y en otras realizaciones de la especificación, el término medio de crecimiento se refiere generalmente a un medio suficiente para el cultivo de PPDCs. En particular, un medio actualmente preferido para el cultivo de células de la invención es el Medio Esencial Modificado de Dulbecco (también abreviado DMEM - Dulbecco's Modified Essential Media en este documento). Particularmente preferido es el DMEM - de baja glucosa (también referido como DMEM - LG (low glucose) en este documento) (Invitrogen, Carlsbad, CA). El DMEM - de baja glucosa es suplementado preferiblemente con un 15% (volumen / volumen) de suero bovino fetal (por ejemplo, suero bovino fetal definido, Hyclone, Logan UT), antibióticos / antimicrobianos ((preferiblemente 50 - 100 Unidades / mililitro de penicilina, 50-100 µg / mililitros de estreptomina, y 0 - 0.25 microgramos / mililitros de anfotericina B; Invitrogen, Carlsbad, CA)), y 0.001% (volumen / volumen) de 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis MO). Tal como se usa en los ejemplos a continuación, el medio de crecimiento se refiere a DMEM - de baja glucosa con un 15% de suero bovino fetal y antibióticos / antimicrobianos (cuando se incluye penicilina / estreptomina, es preferiblemente a 50 Unidades / mililitro y 50 µg / mililitro respectivamente; cuando se utiliza penicilina / estreptomina / anfotericina B, es preferible a 100 unidades / mililitro, 100 µg/mililitro y 0.25 microgramos / mililitro, respectivamente). En algunos casos se utiliza medio diferente de crecimiento, o se suministran diferentes suplementaciones, y estas son indicadas normalmente en el texto como suplementaciones al medio de crecimiento.

25 Las siguientes abreviaciones pueden aparecer en los ejemplos y en otras realizaciones en la especificación y las declaraciones: ANG (o Ang2) para angiopoyetina 2; APC (antigen-presenting cells) para las células que contienen antígenos; BDNF (brain-derived neurotrophic factor) para el factor neuro - trófico derivado del cerebro; BDNF (brain-derived neurotrophic factor) para el factor neuro - trófico derivado del cerebro; bid (BID) para "bis in die" (dos al día); CK18 para citoqueratina 18; CNS (central nervous system) para el sistema nervioso central; ligando CXC 3 para el ligando receptor de quimioquinas 3; DMEM (DMEM for Dulbecco's Minimal Essential Medium) para el Medio Esencial Mínimo de Dulbecco; DMEM: Ig (DMEM with low glucose) (o DMEM: Lg, DMEM: LG) de DMEM con bajo nivel de glucosa; EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid) para ácido etilendiaminotetraacético; EGF (epidermal growth factor) (o E) para el factor de crecimiento epidérmico; FACS para (fluorescent activated cell sorting) clasificación de células activadas con fluorescencia; FBS (fetal bovine serum) para el suero fetal bovino; FGF (fibroblast growth factor) (o F) para el factor de crecimiento de fibroblastos; GCP-2 (granulocyte chemotactic protein-2) para la proteína de quimiotaxis de granulocitos -2; GF AP (glial fibrillary acidic protein) para la proteína ácida glial fibrilar; HB-EGF (heparin-binding epidermal growth factor) para el factor de crecimiento epidérmico de vinculación a heparina; HCAEC (Human coronary artery endothelial cells) para las células endoteliales de la arteria coronaria Humana; HGF (hepatocyte growth factor) para el factor de crecimiento de hepatocitos; hMSC (Human mesenchymal stem cells) para las células madre mesenquimales humanas; HNF-1 alfa (hepatocyte-specific transcription factor) para el factor de transcripción específico de hepatocitos; HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells) para las células endoteliales de la vena umbilical humana; 1309 para una quimiocina y el ligando para el receptor CCR8; IGF-1 (insulin-like growth factor 1) para el factor de crecimiento similar a la insulina-1; IL-6 para la interleucina-6; IL-8 para la interleucina 8; K19 (keratin 19) para la queratina 19; K8 (keratin 8) para la queratina 8; KGF (keratinocyte growth factor) para el factor de crecimiento de queratinocitos; LIF (leukemia inhibitory factor) para el factor inhibidor de la leucemia; MBP (myelin basic protein) para la proteína básica de la mielina; MCP-1 (monocyte chemotactic protein 1) para la proteína quimiotáctica de monocitos 1; MDC (macrophage-derived chemokine) para la quimiocina derivada de macrófagos; MIP 1 (macrophage inflammatory protein 1 alpha) para proteína inflamatoria de macrófagos alfa 1; MIP1beta (macrophage inflammatory protein 1beta) para proteína inflamatoria de macrófagos beta 1; MMP (matrix metalloprotease) para la matriz de metaloproteasas; MSC (mesenchymal stem cells) para las células madre mesenquimales; NHDF (Normal Human Dermal Fibroblasts) para fibroblastos dérmicos humanos normales; NPE (Neural Progenitor Expansion media) para medios de Expansión Progenitores Neurales; O4 para oligodendrocitos o marcadores de diferenciación glial O4; PBMC (Peripheral blood mononuclear cell) para células periféricas mononucleares de sangre; PBS (phosphate buffered saline) para tampón fosfato salino; PDGFBB (platelet derived growth factor) para factor de crecimiento derivado de plaquetas; PO para "per os" (por la boca); PNS (peripheral nervous system) para el sistema nervioso periférico; Rantes (o RANTES - regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) para activación regulada de las células T normales expresadas y secretadas; rhGDF-5 (recombinant human growth and differentiation factor 5) para el factor de diferenciación y crecimiento recombinante humano 5; SC por vía subcutánea; SDF-1 alfa (stromal-derived factor 1alpha) para el factor derivado de estromas 1alfa; SHH para el sonic hedgehog; SOP (standard operating procedure) para procedimiento operativo estándar; TARC (thymus and activation-regulated chemokine) para el timo y quimioquinas de activación regulada; TCP (Tissue culture plastic) para el plástico para cultivo de tejidos; TCPS (tissue culture polystyrene) para poliestireno para cultivo de tejido; TGFbeta2 (transforming growth factor beta2) de factor de crecimiento transformante beta 2; TGF beta-3 (transforming growth factor beta-3) para factor de crecimiento transformante beta-3; TIMP1 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1) para tejido inhibidor de metaloproteinasas matriciales 1; TPO para trombopoyetina; TuJ1 para

tubulina III; VEGF (vascular endothelial growth factor) para el factor de crecimiento endotelial vascular; vWF (von Willebrand factor) para el factor de von Willebrand; y alpFP (alpha-fetoprotein) para fetoproteína alfa.

## EJEMPLO 1

5

### Derivación de células del tejido de postparto

Este ejemplo describe la preparación de células derivadas de postparto de tejidos placentarios y del cordón umbilical. Los cordones umbilicales y placentas de postparto fueron obtenidos en el momento del nacimiento ya sea de un embarazo de término completo o parcial. Las células fueron cosechadas de cinco donantes separados de tejidos umbilicales y placentarios. Diferentes métodos de aislamiento celular fueron probados por su habilidad de producción celular con: 1) el potencial para diferenciarse en células con diferentes fenotipos, una característica común de las células madre, o 2) el potencial de suministrar factores tróficos útiles para otras células y tejidos.

### 15 Métodos y Materiales

**Aislamiento celular umbilical.** Los cordones umbilicales fueron obtenidos del National Disease Research Interchange (Intercambio Nacional de Investigación de Enfermedades - NDRI, Filadelfia, PA). Los tejidos fueron obtenidos después de partos normales. El protocolo de aislamiento celular fue realizado asépticamente en una campana de flujo laminar. Para remover la sangre y los vestigios, se lavó el cordón en tampón fosfato salino (PBS; Invitrogen, Carlsbad, CA) con la presencia de antimicóticos y antibióticos (100 Unidades / mililitros de penicilina, 100 µg / mililitros de estreptomina, 0.25 microgramos / mililitros de anfotericina B). Los tejidos fueron desasociados mecánicamente entonces en platos de cultivos de 150 cm<sup>2</sup> con la presencia de 50 ml de medio (DMEM - de baja glucosa o DMEM - de alta glucosa; Invitrogen), hasta que el tejido que de desmenuzando en una pulpa fina. Los tejidos picados fueron transferidos a tubos cónicos de 50 ml (aproximadamente 5 g de tejido por tubo). Este tejido fue digerido entonces en un medio DMEM - de baja glucosa o un medio DMEM - de alta glucosa, cada uno con antimicóticos y antibióticos como se mencionó antes. En algunos experimentos, se usó una mezcla de enzimas de colagenasa y dispasa ("C:D;" colagenasa (Sigma, St Louis, MO), 500 Unidades / mililitro; dispasa (Invitrogen), 50 U/mililitro en DMEM - de baja glucosa). En otros experimentos se usó una mezcla de colagenasa, dispasa y hialuronidasa ("C:D:H") (colagenasa, 500 Unidades / mililitro; dispasa 50 Unidades / mililitro; y hialuronidasa (Sigma), 5 Unidades / mililitro, en DMEM - de baja glucosa). Los tubos cónicos que contenían el tejido, el medio y las enzimas de digestión fueron incubados a 37 °C en un agitador orbital (Enviro, Brooklyn, NY) a 225 revoluciones por minuto durante dos horas.

Después de la digestión, los tejidos fueron centrifugados a 150 x g durante cinco minutos, los materiales flotantes fueron aspirados. El pellet fue re - suspendido en 20 ml de medio de crecimiento (DMEM: de baja glucosa (Invitrogen), 15% (volumen / volumen) de suero fetal bovino (FBS; suero bovino definido; ; Lote#AND18475; Hyclone, Logan, UT), 0.001% (volumen / volumen) de 2-mercaptoetanol (Sigma), 1 ml por 100 ml de antibióticos/antimicóticos como se describió anteriormente. La suspensión celular fue filtrada a través de un servidor de células de nylon de 70 µm (BD Biosciences). Un enjuague adicional de 5 ml que contenía el medio de crecimiento fue pasado a través del filtro. La suspensión celular fue pasada entonces a través de un cernidor celular de nylon de 40 µm (BD Biosciences) y perseguida con un enjuague de 50 ml adicionales del medio de crecimiento.

La filtración fue resuspendida en el medio de crecimiento (volumen total de 50 ml) y centrifugada a 150 x g durante cinco minutos. El material flotante fue aspirado y las células fueron re-suspendidas en 50 ml de medio de crecimiento fresco. Este proceso se repitió dos veces más.

Al final de la centrifugación el material flotante fue aspirado y el pellet de células fue re - suspendido en 5 ml de medio de crecimiento fresco. El número de células viables fue determinado usando coloración de Tripano azul. Las células se cultivaron entonces bajo condiciones estándar.

Las células aisladas de cordones umbilicales fueron sembradas a 5000 células/centímetro cuadrado en matraces T de 75 cm<sup>2</sup> cubiertos de gelatina (Corning Inc., Corning, NY) en un medio de crecimiento con antibióticos / antimicóticos como se describió anteriormente. Después de dos días (en varios experimentos, las células se incubaron de 2 - 4 días), el medio consumido era aspirado de los matraces. Las células fueron lavadas con PBS tres veces para remover los vestigios y las células derivadas de la sangre. Las células fueron re - abastecidas con medio de crecimiento y se les permitió crecer hasta alcanzar la confluencia (alrededor de 10 días desde el pase cero) al pase uno. En pases subsiguientes (desde el pase uno al dos y así progresivamente), las células alcanzaron su-confluencia (75 - 85% de confluencia) en cuatro - cinco días. Para estos pases subsiguientes, las células fueron sembradas a 5000 células / centímetro cuadrado. Las células fueron cultivadas en una incubadora humidificada con un 5% de dióxido de carbono y oxígeno atmosférico, a 37 °C.

**Aislamiento celular placentario.** El tejido placentario o fue obtenido de NDRI (Filadelfia, PA). Los tejidos fueron de un embarazo y fueron obtenidos en el momento de una entrega quirúrgica normal. Las células placentarias fueron aisladas como se describió en el aislamiento umbilical.

65

El siguiente ejemplo aplica al aislamiento de poblaciones separadas de células derivadas maternas y derivadas neonatales del tejido placentario.

5 El protocolo de aislamiento celular fue realizado asépticamente en una campana de flujo laminar. El tejido placentario fue lavado en tampón fosfato salino (PBS; Invitrogen, Carlsbad, CA) con antimicóticos y antibióticos (como se describió anteriormente) para remover la sangre y los vestigios. El tejido placentario fue separado entonces en tres secciones: línea superior (el lado o aspecto neonatal) la línea del medio (aislamiento celular mixto neonatal y maternal) y la línea inferior (lado o aspecto maternal).

10 Las secciones separadas fueron lavadas individualmente varias veces en PBS con antibióticos / antimicóticos para remover aún más la sangre y los vestigios. Cada sección fue desasociada mecánicamente en platos de cultivos de tejido de 150 cm<sup>2</sup> en la presencia de 50 ml de DMEM / de baja glucosa, a una pulpa fina. La pulpa fue transferida a tubos cónicos de 50 ml. Cada tubo contenía aproximadamente 5 g de tejido. El tejido fue digerido ya sea en DMEM - de baja glucosa o en DMEM - de alta glucosa, ambos medios con antimicóticos y antibióticos (100 Unidades / mililitro de penicilina, 100 µg / mililitro de estreptomina, 0.25 microgramos / mililitro de anfotericina B) y enzimas digestivas. En algunos experimentos una mezcla de enzimas de colagenasa dispasa ("C:D") fue utilizada conteniendo colagenasa (Sigma, St Louis, MO) a 500 Unidades / mililitro y dispasa (Invitrogen) a 50 Unidades / mililitro en DMEM - de baja glucosa. En otros experimentos se utilizó una mezcla de colagenasa, dispasa e hialuronidasa (C:D:H) (colagenasa, 500 Unidades por mililitro; y dispasa 50 Unidades / mililitro, e hialuronidasa (Sigma), 5 Unidades / mililitro en DMEM - de baja glucosa. Los tubos cónicos que contenían el tejido, medio y enzimas digestivas fueron incubados durante dos horas at 37 °C en un agitador orbital (Environ, Brooklyn, NY) a 225 revoluciones por minuto.

25 Después de la digestión, los tejidos fueron centrifugados a 150 x g durante cinco minutos, el material flotante resultante fue aspirado. El pellet fue re - suspendido en 20 ml de medio de crecimiento con penicilina / estreptomina / anfotericina B. La suspensión celular fue filtrada a través de una cerní deberá celular de nylon de 70 µm (BD Biosciences), perseguida por un enjuague con 5 ml adicionales de medio de crecimiento. La suspensión celular total fue pasada a través de un filtro celular de nylon de 40 µm (BD Biosciences) seguido por 5 ml adicionales de medio de crecimiento como un enjuague.

30 La filtración fue resuspendida en el medio de crecimiento (volumen total de 50 ml) y centrifugado a 150 x g durante cinco minutos. Este proceso fue repetido dos veces más. Después de la centrifugación final, el material flotante fue aspirado y el pellet de células fue re - suspendido en 5 ml de medio de crecimiento fresco. Un conteo de células fue determinado usando la prueba de exclusión de tripano azul. Las células fueron cultivadas entonces a condiciones estándar.

35 **Aislamiento de células LIBERASE.** Las células fueron aisladas de tejidos umbilicales en un medio DMEM- de baja glucosa con LIBERASE (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN) (2.5 miligramos por mililitro, Blendzyme 3; Roche Applied Sciences, Indianapolis, IN) e hialuronidasa (5 Unidades / mililitro, Sigma). La digestión del tejido y el aislamiento de las células fue, como se describió para otras digestiones de proteasas anteriormente, usando la mezcla LIBERASE / hialuronidasa en lugar de las mezclas enzimáticas C:D o C:D:H. La digestión de tejidos con LIBERASE resultó en que el aislamiento de las poblaciones celulares de los tejidos de postparto se expandieron fácilmente.

45 **El Aislamiento celular usando otras combinaciones enzimáticas.** Los procedimientos fueron comparados para aislar las células del cordón umbilical usando varias combinaciones enzimáticas. Las enzimas comparadas para la digestión incluyeron: i) colagenasa; ii) dispasa; iii) hialuronidasa; iv) mezcla de colagenasa: dispasa (C:D); v) mezcla de colagenasa: hialuronidasa (C:H); vi) mezcla de dispasa: hialuronidasa (D:H); y vii) mezcla de colagenasa: dispasa: hialuronidasa (C:D:H). Las diferencias en el aislamiento celular utilizando estas diferentes condiciones de digestión enzimática se observaron (Tabla 1-1).

55

60

65

**Tabla 1-1** Aislamiento de células del tejido de cordón umbilical usando varias combinaciones enzimáticas.

Enzimas de Digestión	Células Aisladas	Expansión de células
Colagenasa	X	X
Dispasa	+ (>10 h)	+
Hialuronidasa	X	X
Colagenasa : Dispasa	++ (< 3 h)	++
Colagenasa : Hialuronidasa	++ (< 3 h)	+
Dispasa : Hialuronidasa	+ (>10 h)	+
Colagenasa : Dispasa : Hialuronidasa	+++ (< 3 h)	+++
Clave: + = buena, ++ = muy buena, +++ = excelente, X = no hubo éxito bajo las condiciones probadas		

**Aislamiento de células de la sangre residual en los cordones.** Se hicieron otros intentos de aislar grupos de células del cordón umbilical con diferentes métodos. En una instancia, el cordón umbilical fue dividido y lavado con un medio de crecimiento para desalojar los coágulos de sangre y el material gelatinoso. La mezcla de sangre, material gelatinoso y medio de crecimiento fue recolectado y centrifugado a 150 x g. El pellet fue re-suspendido y sembrado en matraces cubiertos con gelatina en un medio de crecimiento. De estos experimentos una población celular fue aislada y se expandió fácilmente.

**Aislamiento de células de la sangre del cordón.** También se aislaron las células de las muestras de sangre del cordón obtenidas del NRD. El protocolo de aislamiento usado aquí fue el de la aplicación internacional de patente US0229971 by Ho et al (Ho, T. W. et al., WO2003025149 A2). Las muestras (50 ml y 10.5 mililitros, respectivamente) de sangre del cordón umbilical (NDR, Filadelfia, PA) fueron mezcladas con amortiguador de lisis (155 mM de cloruro de amonio filtrado y esterilizado, 10 mmol de bicarbonato de potasio, 0.1 milimoles de EDTA amortiguado a un pH de 7.2 (todos los componentes de Sigma, St. Louis, MO)). Las células fueron lisadas a una tasa de 1:20 de sangre de cordón a amortiguador lisis. La suspensión celular resultante fue mezclada mediante vórtex durante cinco segundos, e incubada por dos minutos a temperatura ambiente. El lisado fue centrifugado (10 minutos a 200 x g). El pellet celular fue re-suspendido en un medio esencial mínimo completo (Gibco, Carlsbad CA) que contenía un 10% de suero bovino fetal (Hyclone, Logan UT), 4 mmol de glutamina (Mediatech Herndon, VA), 100 unidades de penicilina por 100 ml y 100 µg de estreptomina por 100 ml (Gibco, Carlsbad, CA). Las células re-suspendidas fueron centrifugadas (10 minutos a 200 x g), el material flotante fue aspirado, y el pellet de células fue lavado en el medio completo. Las células fueron sembradas directamente en las matraces T 75 (Corning, NY), matraces cubiertos con laminina T 75, o matraces cubiertas con fibronectina T 175 (ambas Becton Dickinson, Bedford, MA).

**Aislamiento de las células usando diferentes combinaciones enzimáticas y condiciones de crecimiento.** Para determinar si es que las poblaciones celulares podrían ser aisladas bajo diferentes condiciones y expandidas bajo una variedad de condiciones inmediatamente después del aislamiento, las células fueron digeridas en medios de crecimiento con o sin 0.001% (volumen/volumen) de 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), usando la combinación enzimática de C:D:H, de acuerdo a los procedimientos provistos anteriormente. Las células derivadas de la placenta fueron aisladas de esa forma bajo una variedad de condiciones. Todas las células fueron cultivadas con penicilina / estreptomina. (Tabla 1-2).

**Tabla 1-2:** aislamiento y expansión de cultivos de células derivadas de postparto bajo varias condiciones:

Condición	Medio	15% FBS	B M E	Gelatina	20% O <sub>2</sub>	Factores de crecimiento
1	DMEM-Lg	Y	Y	Y	Y	N
2	DMEM-Lg	Y	Y	Y	N (5%)	N
3	DMEM-Lg	Y	Y	N	Y	N
4	DMEM-Lg	Y	Y	N	N (5%)	N
5	DMEM-Lg	N (2%)	Y	N (Laminina)	Y	EGF/FGF (20 ng/mL)
6	DMEM-Lg	N (2%)	Y	N (Laminina)	N (5%)	EGF/FGF (20 ng/mL)
7	DMEM-Lg	N (2%)	Y	N (Fibrone)	Y	PDGF/VEGF
8	DMEM-Lg	N (2%)	Y	N (Fibrone)	N (5%)	PDGF/VEGF
9	DMEM-Lg	Y	N	Y	Y	N
10	DMEM-Lg	Y	N	Y	N (5%)	N
11	DMEM-Lg	Y	N	N	Y	N
12	DMEM-Lg	Y	N	N	N (5%)	N
13	DMEM-Lg	N (2%)	N	N (Laminina)	Y	EGF/FGF (20 ng/mL)
14	DMEM-Lg	N (2%)	N	N (Laminina)	N (5%)	EGF/FGF (20 ng/mL)
15	DMEM-Lg	N (2%)	N	N (Fibrone)	Y	PDGF/VEGF
16	DMEM-Lg	N (2%)	N	N (Fibrone)	N (5%)	PDGF/VEGF

**Aislamiento de células utilizando diferentes combinaciones de enzimas y condiciones de crecimiento.** En todas las condiciones las células se adhirieron y expandieron bien entre los pases 0 y 1 (Tabla 1-2). Se demostró que las células en condiciones 5 - 8 y 13 - 16 proliferaron bien hasta cuatro pases después de la siembra, momento en el cual se conservaron criogénicamente y se almacenaron.

**Resultados**

**Aislamiento de células utilizando diferentes combinaciones enzimáticas.** La combinación de C:D:H, suministró la mejor producción de células después del aislamiento, y las células generadas se expandieron por muchas generaciones más en cultivos que las otras condiciones (Tabla 1). Una población expandible de células no fue lograda utilizando exclusivamente colágeno o hialuronidasa. No se hizo un intento de determinar si este resultado es específico al colágeno que fue probado

**Aislamiento de células utilizando diferentes combinaciones enzimáticas y condiciones de crecimiento.** Las células se adhirieron y expandieron bien entre los pases 0 y 1 bajo todas las condiciones probadas de digestión enzimática y crecimiento (Tabla 2). Las células en condiciones experimentales 5 - 8 y 13 - 16 proliferaron bien hasta 4 pases después de la siembra, momento en el cual fueron conservadas criogénicamente. Todas las células fueron almacenadas para mayor investigación.

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

**Aislamiento de células de la sangre del cordón.** La preparación contenía células rojas de sangre y plaquetas. Ninguna célula nucleada se había adherido y dividido durante las primeras tres semanas. El medio fue cambiado tres semanas después de la siembra y no se observó que ninguna célula se haya adherido y crecido.

**Resumen.** Las poblaciones de células pueden derivarse del cordón umbilical y del tejido placentario eficientemente usando la combinación de enzimas de collagenasa (una metaloproteasa matricial), dispasa (una proteasa neutra) hialuronidasa (una enzima mucolítica que se descompone en ácido hialurónico). También podría usarse LIBERASE, que es una Blendzyme. Específicamente Blendzyme 3, que es collagenasa (4 unidades deseadas

/ g) y termolisina (1714 unidades de caseína / g) también se usó junto con hialuronidasa para aislar células. Estas células se expandieron rápidamente por muchos pases cuando se las cultivó en el medio de crecimiento en plástico cubierto con gelatina.

5 Las células también se aislaron de sangre residual en los cordones, pero no en la sangre del cordón. La presencia de células en los coágulos de sangre que se enjuagaron del tejido, que se adhiere y crece bajo las condiciones utilizadas, podría deberse a que las células se liberan durante el proceso de disección.

10 **EJEMPLO 2**

**Características de crecimiento de las células derivadas de postparto**

15 El potencial de expansión celular de las células derivadas de postparto (PPDCs) fue comparado a otras poblaciones de células madres aisladas. El proceso de expansión celular hasta la senectud es referido de acuerdo al límite de Hayflick. (Hayflick L. 1974a, 1974b). Las células derivadas de postparto son altamente apropiadas para su uso terapéutico porque pueden expandirse fácilmente en números suficientes.

**Materiales y métodos**

20 **Matraces cubiertos de gelatina.** Matraces de plástico para cultivos de tejidos fueron cubiertos al añadir 20 ml un 2% (masa / volumen) de gelatina porcina (tipo B: 225 Bloom; Sigma, St Louis, MO) a matraces T 75 (Corning, Corning, NY) durante 20 minutos a la temperatura del cuarto. Después de remover la solución gelatinosa, se agregó tampón fosfato salino (PBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA) y después se aspiró.

25 **Comparación del potencial de expansión de las PPDCs con otras poblaciones celulares.** Para comparación del potencial de expansión de crecimiento las siguientes poblaciones celulares fueron utilizadas: i) células madre mesénquima (MSC - Mesenchymal stem cells; Cambrex, Walkersville, MD); ii) células derivadas de adiposas (patente de Estados Unidos número 6555374 B1; aplicación de patente de Estados Unidos US20040058412); iii) fibroblastos de piel dérmicos normales (cc-2509 lote # 9F0844; Cambrex, Walkersville, MD); iv) 30 células derivadas umbilicales; y v) células derivadas de la placenta. Las células fueron sembradas inicialmente a 5000 células / centímetros cuadrados en matraces T 75 cubiertos de gelatina en medios de crecimiento con penicilina / estreptomycin / anfotericina B. Para pases subsiguientes, los cultivos celulares fueron tratados de la siguiente forma. Después de su tripnización, se contaron las células viables después de colorarlas con Tripano Azul. La suspensión celular (50 µl) fue combinada con tripano azul (50 ml, Sigma, St. Louis MO). El número de células 35 viables se estimó usando un hemocitómetro.

40 Después del conteo, las células fueron sembradas a 5000 células / centímetros cuadrados en matraces T 75 cubiertos de gelatina en 25 ml de medio de crecimiento. Las células fueron cultivadas bajo condiciones estándar a 37 °C. El medio de crecimiento fue cambiado dos veces a la semana. Cuando las células alcanzaron un 85% de confluencia fueron pasadas; este proceso fue repetido hasta que las células alcanzaron la senectud.

45 En cada pase, las células fueron tripnizadas y contadas. La producción de células viables, doblajes de población [en (células finales / células iniciales) / en 2] y el tiempo de doblaje (tiempo en el cultivo (h) / doblajes de población) fueron calculados. Con el fin de determinar la expansión celular óptima, la producción total de células por pase fue determinado al multiplicar la producción total del pase anterior por el factor de expansión para cada pase (por ejemplo, factor de expansión = células finales / células iniciales).

50 **El potencial de expansión de los bancos de células a poca densidad.** La expansión potencial de las células almacenadas en el pase 10 también fue probado, usando un conjunto diferente de condiciones. Se probaron fibroblastos de piel dérmica normal (cc-2509 lote # 9F0844; Cambrex, Walkersville, MD), células derivadas umbilicales, y células derivadas de la placenta. Esta población celular había sido almacenada en el pase 10 previamente, y había sido cultivada a 5000 células por centímetro cuadrado hasta la confluencia en cada pase hasta ese punto. Se determinó el efecto de la densidad celular en las poblaciones celulares después de ser descongeladas en el pase 10. Las células fueron descongeladas bajo condiciones estándar y contadas usando la coloración de 55 tripano azul. Las células descongeladas fueron entonces sembradas a 1000 células / centímetro cuadrado en el medio de crecimiento DMEM: de baja glucosa con antibióticos / antimicóticos como se describió anteriormente. Las células fueron cultivadas bajo condiciones atmosféricas estándar a 37 °C. El medio de crecimiento fue cambiado dos veces a la semana y las células fueron pasadas cuando alcanzaron el 85% de confluencia. Las células fueron pasadas subsecuentemente hasta la senectud, en otras palabras, hasta que no podían expandirse más. Las células 60 fueron tripnizadas y contadas en cada pase. La producción celular, doblaje poblacional (en (células finales / células iniciales) / en 2) y el tiempo de doblaje (tiempo en el cultivo (h) / doblajes de población). La producción al por pase fue determinada al multiplicar la producción total del pase anterior por el factor de expansión para cada pase (por ejemplo, factor de expansión = células finales / células iniciales).

65 **Expansión de las PPDCs a baja densidad desde la siembra inicial.** Se probó La expansión potencial de PPDCs aisladas frescas bajo condiciones de siembra celular baja. Las PPDCs fueron preparadas como se describió

anteriormente. Las células fueron sembradas a 1000 células / centímetro cuadrado y pasadas como se describió antes hasta la senectud. Las células fueron cultivadas bajo condiciones atmosféricas estándar a 37 °C. El medio de crecimiento fue cambiado dos veces a la semana. Las células fueron pasadas cuando alcanzaron el 85% de confluencia. En cada pase las células fueron tripnizadas y contadas por la coloración de tripano azul. La producción celular, los doblajes de población (en (células finales / células iniciales)/ en dos) y tiempo de doblaje (tiempo en el cultivo (h) / doblaje poblacional) fueron calculados en cada pase. La producción celular total por pase fue determinada al multiplicar la producción total en el pase anterior por el factor de expansión en cada pase (en otras palabras, factor de expansión = células finales / células iniciales). Las células fueron cultivadas en matraces cubiertos de gelatina y en matraces sin cobertura de gelatina.

**La expansión de células clónicas neonatales derivadas de la placenta.** Se utilizó clonación para expandir una población de células neonatales de tejido placentario. Después del aislamiento de tres poblaciones celulares diferenciales de la placenta (como se describe aquí), estas poblaciones celulares fueron expandidas bajo condiciones de crecimiento estándar y después se analizaron los cariotipos para revelar la identidad de las poblaciones celulares aisladas. Puesto que las células fueron aisladas de una madre que tuvo un hijo, fue fácil el distinguir entre los cromosomas masculinos y femeninos al realizar propagaciones de metafase. Estos experimentos demostraron que las células de aspecto fetal tuvieron cariotipos positivos para el fenotipo neonatal, las células de la capa media tuvieron cariotipos positivos de ambos fenotipos neonatal y materno y las células de aspecto materno tuvieron cariotipos positivos para las células maternas.

**Expansión de células en condiciones de cultivos con bajo oxígeno.** Se ha demostrado que condiciones de cultivos celulares de bajo oxígeno pueden mejorar la expansión celular en ciertas circunstancias (US20040005704). Para determinar si la expansión celular de las PPDCs podría mejorarse al alterar las condiciones de los cultivos celulares, los cultivos de las células derivadas umbilicales crecieron en condiciones de bajo oxígeno. Las células fueron sembradas a 5000 células / centímetro cuadrado en un medio de crecimiento en matraces cubiertos con gelatina. Las células se cultivaron inicialmente bajo condiciones atmosféricas estándar hasta el pase cinco. En el cual fueron transferidas a condiciones de cultivos de bajo oxígeno (5% O<sub>2</sub>).

**Otras condiciones de crecimiento.** En otros protocolos, las células se expandieron en platos sin cobertura, con cobertura de colágeno, con cobertura de fibronectina, con cobertura de laminina y con cobertura de proteína de una matriz celular. Los cultivos han demostrado expandirse bien en estas matrices.

**Resultados**

**Comparación del potencial de expansión de las PPDCs con otras poblaciones de células madre y células no madre.** Ambas células derivadas umbilicales y derivadas de la placenta se expandieron por más de 40 pases generando producciones celulares de > 1E17 células en 60 días. En contraste, las MSCs y los fibroblastos alcanzaron la senectud después de < 25 días y < 60 días, respectivamente. Aunque las células derivadas de la adiposa se expandieron durante casi 60 días obtuvieron una producción celular total de 4.5E12. Por lo tanto, cuando se sembraron a 5000 células / centímetro cuadrado, bajo las condiciones experimentales utilizadas, las células derivadas de postparto se expandieron mucho mejor que los otros tipos de células cultivados bajo las mismas condiciones (Tabla 2 - 1).

**Tabla 2 - 1:** Características de crecimiento para diferentes poblaciones celulares cultivadas hasta la senectud.

Tipo de Célula	Senectud	Doblajes de Población Totales	Producción Celular Total
MSC	24 d	8	4.72 E7
Adiposa	57 d	24	4.5 E12
Fibroblastos	53 d	26	2.82 E13
Umbilical	65 d	42	6.15 E17
Placenta	80 d	46	2.49 E19

**Potencial de expansión de bancos de células a una densidad baja.** Las células derivadas umbilicales, de la placenta y fibroblastos se expandieron por más de 10 pases generando producciones de células de > 1E11 células en 60 días (Tabla 2 - 2). Después de 60 días bajo estas condiciones los fibroblastos alcanzaron la senectud mientras que las poblaciones de células derivadas umbilicales y de la placenta alcanzaron la senectud después de 80 días, completando doblajes superiores a 50 y 40 respectivamente.

**Tabla 2 - 2:** Características de crecimiento para diferentes poblaciones celulares usando expansión de crecimiento de baja densidad desde el pase 10 hasta la senectud

Tipo de célula	Senectud	Doblajes de población totales	Producción celular total
Fibroblasto (P10)	80 d	43.68	2.59 E11
Umbilical (P10)	80 d	53.6	1.25 E14
Placenta (P10)	60 d	32.96	6.09 E12

**Expansión de las PPDCs a baja densidad desde su siembra inicial.** Las PPDCs se expandieron a baja densidad (1000 células por centímetro cuadrado) en platos o matraces cubiertos con gelatina y sin cobertura de gelatina. El potencial de crecimiento de estas células bajo estas condiciones fue buena. Las células expandieron rápidamente en un crecimiento logarítmico por fases. La tasa de expansión celular fue similar a la observada cuando las células derivadas de la placenta fueron sembradas a 5000 células por centímetro cuadrado en matraces cubiertos con gelatina en un medio de crecimiento. No existieron diferencias en la expansión potencial de células entre cultivos ya sea en matraces sin cobertura o matraces con cobertura de gelatina. Sin embargo, las células tuvieron una apariencia fenotípica más pequeña en los matraces cubiertos con gelatina y fenotipos celulares muchos más grandes fueron observados en los matraces sin cobertura.

**Expansión de células neonatales o maternas clónicas o derivadas de la placenta.** Una población de células neonatales o maternas clónicas pueden expandirse de células derivadas de la placenta aisladas de un aspecto neonatal o de un aspecto materno, respectivamente, de la placenta. Las células se diluyeron en serie y entonces se sembraron en platos cubiertos con gelatina en medios de crecimiento para su expansión a 1 célula por pozo en platos cubiertos de gelatina de 96 pozos. Desde este clonaje inicial, se identificaron, tripnizaron, y se re - sembraron en platos cubiertos de gelatina de 12 pozos en un medio de crecimiento y subsiguientemente se pasaron a matraces cubiertos de gelatina T 25 a 5000 células por centímetro cuadrado en el medio de crecimiento. Se realizó un sub - clonaje para asegurar que una población clónica de células se haya identificado. Para experimentos de sub - clonaje, las células se tripnizaron y se re - sembraron a 0.5 células por pozo. Los sub - clones que crecen bien se expanden en matraces T 25 cubiertos con gelatina a 5000 células por centímetro cuadrado. Las células pasan a 5000 células por centímetro cuadrado a matraces T 75. Las características de crecimiento de un clon pueden ser graficadas para demostrar la expansión celular. Un análisis de cariotipos puede confirmar que el clon es neonatal o materno.

**Expansión de las células en condiciones de cultivos de bajo oxígeno.** Las células se expandieron bien bajo las condiciones de oxígeno reducido, sin embargo, el cultivar en condiciones de bajo oxígeno no pareció tener un efecto significativo en la expansión de las células PPDCs con las condiciones utilizadas.

**Resumen.** Las condiciones de expansión celular que involucran el crecimiento aislado de células derivadas de postparto a densidades de alrededor de 5000 células por centímetro cuadrado, en un medio de crecimiento en matraces cubiertos con gelatina o no cubiertos con gelatina, con un oxígeno atmosférico estándar, son suficientes para generar un número abundante de células en el pase 11. Aún más, los datos sugieren que las células pueden ser expandidas fácilmente usando condiciones de cultivos de baja densidad (por ejemplo, 1000 células por centímetro cuadrado). La expansión de células derivadas de postparto en condiciones de bajo oxígeno también facilita la expansión, aunque no se ha observado que exista una mejora incremental en la potencialidad de expansión cuando se utilizan estas condiciones de crecimiento. Actualmente, es preferible el cultivar las células derivadas de postparto bajo condiciones atmosféricas estándar para generar grandes reservas de células. Sin embargo, cuando las condiciones de cultivo se alteran, la expansión de células derivadas de postparto también puede alterarse. Esta estrategia podría ser utilizada para impulsar la capacidad proliferativa y diferencial de estas poblaciones de células.

Bajo las condiciones utilizadas, aunque el potencial de expansión de las MSC y de las células derivadas de adiposa es limitado, las células derivadas de postparto se expanden fácilmente en grandes números.

**Referencias para el ejemplo 2**

- 1) Hayflick L. 1974a. J Am Geriatr Soc. 22:1-12.
- 2) Hayflick L. 1974b. Gerontologist. 14:37-45.
- 3) Publicación de patente de Estados Unidos US20040058412
- 4) Publicación de patente de Estados Unidos US20040048372
- 5) Publicación de patente de Estados Unidos US20040005704.

**EJEMPLO 3**

**Evaluación del medio de crecimiento para células derivadas de la placenta**

Se evaluaron algunos medios de cultivos de células debido a su habilidad para dar apoyo al crecimiento de las células derivadas de la placenta. El crecimiento de las células derivadas de la placenta con un nivel normal de oxígeno (20%) y un nivel bajo (5%) fue evaluado durante 3 días usando ensayos colorimétricos MTS.

5 **Métodos y materiales**

10 Las células derivadas de la placenta en el pase ocho (P8) fueron sembradas a  $1 \times 10^3$  células por pozo 96 platos de pozos en medios de crecimiento con penicilina / estreptomina. Después de ocho horas el medio se cambió como se describe a continuación y las células se incubaron con niveles de oxígeno normal (atmosférico) o bajo 5%, (volumen / volumen) a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> x 48 horas. Se agregó MTS al medio de cultivo (CellTiter 96 AQueous, una solución para Ensayos de proliferación celular, Promega, Madison, WI) durante tres horas y la absorción midió 490 nanómetros (Molecular Devices - Dispositivos Moleculares, Sunnyvale CA).

15 **Tabla 3-1.** Medio de cultivo

Medio de cultivo	Proveedor	Suero bovino fetal agregado % (volumen / volumen)
DMEM de baja glucosa	Gibco Carlsbad CA	0.21
DMEM de alta glucosa	Gibco	0.21
RPMI 1640	Mediatech, Inc. Herndon, VA	0.21
Célula libre de gro (libre de sueros, libre de proteínas)	Mediatech, Inc.	-
F10 de Ham	Mediatech, Inc.	0.21
MSCGM (completa con suero)	Cambrex, Walkersville, MD	0.21
Suero completo libre de con albúmina	Mediatech, Inc.	-
Medio de crecimiento	NA	-
F12 de Ham	Mediatech, Inc.	0.21
De Iscove	Mediatech, Inc.	0.21
Medio basal de Eagle	Mediatech, Inc.	
DMEM / F12 (1:1)	Mediatech, Inc.	0.21

40 **Resultados**

Las curvas estándar de los ensayos MTS establecieron una correlación lineal entre un incremento en absorción y un incremento en número celular. Los valores de absorción obtenidos fueron convertidos en números de células estimados y el cambio (%) relativo a la siembra inicial fue calculado.

45 **El efecto del suero.** La adición del suero al medio en condiciones de oxígeno normales resultó en un incremento de dependencia de la dosis reproducible en la absorción y por lo tanto del número de células viables. La adición del suero para completar el MSCGM resultó en una reducción de la dependencia de la dosis en la absorción. En el medio sin agregar suero, las células sólo crecieron apreciablemente en los medios Libre de CELLGRO, F10 de Ham y DMEM.

50 **El efecto del oxígeno.** Niveles bajos de oxígeno parecieron incrementar la tasa de crecimiento de las células en los medios de crecimiento, F10 de Ham y MSCGM. En orden descendiente de crecimiento, los medios que dieron los mejores resultados de crecimiento para las células fueron los medios de crecimiento >MSCGM> Iscove's+10% FBS = DMEM-H +10% FBS = F12 de Ham +10% FBS = RPMI 1640 +10% FBS.

55 **Resumen.** Las células derivadas de la placenta pueden ser producidas en varios medios de cultivos con niveles de oxígeno normal y bajo. El crecimiento a corto plazo de las células derivadas de la placenta fue determinado en 12 medios basales con 0, 2 y 10% (volumen / volumen) de suero en un nivel de oxígeno del 5% o a niveles atmosféricos. En general, las células que se derivan de la placenta no crecieron tan bien como en condiciones libres de suero con la excepción de los medios F10 de Ham y Libre de CELLGRO, los cuales están libres de proteínas. El crecimiento en estos medios libres de suero fue alrededor de 25 - 33% del máximo crecimiento observado en medios que contenían un 15% de suero.

60 **EJEMPLO 4**

65

**Crecimiento de células derivadas de postparto en medios que contienen D - valina**

5 Se ha reportado que los medios que contienen D-valina en vez de la isoforma de L-valina normal pueden ser usados selectivamente para inhibir el crecimiento de células similares a fibroblastos en cultivos (Hongpaisan, 2000; Sordillo et al., 1988). No se conocía previamente si las células derivadas de postparto podrían crecer en medios que contienen D-valina.

**Métodos y materiales**

10 Las células derivadas de la placenta (P3), fibroblastos (P9) y células derivadas umbilicales (P5) fueron sembradas a  $5 \times 10^3$  células por centímetro cuadrado en matraces de 75 cubiertos de gelatina (Corning, Corning, NY). Después de 24 horas el medio se removió y las células se lavaron con tampón de fosfato salino (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) para remover el medio residual. El medio se reemplazó con un medio de crecimiento modificado (DMEM con D-valina (orden especial de Gibco), 15% (volumen / volumen) de suero bovino fetal dializado (Hyclone, Logan, UT), 0.001% (volumen / volumen) de betamercaptoetanol (Sigma), penicilina / estreptomina (Gibco)).

**Resultados**

20 Las células derivadas de la placenta, derivadas umbilicales, y fibroblastos que se sembraron en medios que contenían D - valina no proliferaron, a diferencia de las células sembradas en medios de crecimiento que tenían suero dializado. Las células fibroblastos cambiaron morfológicamente, incrementando su tamaño y cambiando forma. Todas las células murieron y eventualmente se separaron de la superficie del matraz después de cuatro semanas. Estos resultados indican que el medio que contiene D - valina no es apto guiado para el crecimiento selectivo de células derivadas de postparto.

**Referencias para el ejemplo 4**

- 1) Hongpaisan J. 2000. Cell Biol Int. 24:1-7.
- 2) Sordillo LM, Oliver SP, Akers RM. 1988). Cell Biol Int Rep. 12:355 - 64.

**EJEMPLO 5****Medios de conservación criogénica para células derivadas de la placenta**

35 Los medios de conservación criogénica para la preservación de las células derivadas de placenta fueron evaluados.

**Métodos y materiales**

40 Las células derivadas de la placenta cultivadas en un medio de crecimiento en matraces T 75 cubiertos con gelatina fueron lavados con PBS y tripsinizados usando 1 ml de tripsina / EDTA (Gibco). La tripsinización fue detenida al agregar 10 ml del medio de crecimiento. Las células fueron centrifugadas a  $150 \times g$ , se removieron los materiales flotantes, y el pellet de células fue re - suspendido en 1 ml de medio de crecimiento. Una parte de la suspensión de células, 60  $\mu$ l, fue removida y se añadió 60  $\mu$ l de tripano azul (Sigma). El número viable de células fue estimado usando un hemocitómetro. La suspensión de células se dividió en cuatro partes iguales que contenía cada una  $88 \times 10^4$  células. La suspensión de células fue centrifugado y re - suspendido en 1 ml de cada uno de los siguientes medios y transferido a crioviales (Nalgene).

- 50 1. Medio de crecimiento +10% (volumen / volumen) DMSO (Hybrimax, Sigma, St. Louis, MO)
2. Medio de congelación de células con DMSO, con metilcelulosa sin suero (C6295, Sigma, St. Louis, MO)
3. Medio para congelación de células libre de suero (C2639, Sigma, St. Louis, MO)
4. Medio para congelación de células con glicerol (C6039, Sigma, St. Louis, MO)

55 Las células fueron enfriadas aproximadamente a  $-1^\circ\text{C}$  por minuto durante la noche en un congelador a  $-80^\circ\text{C}$  utilizando un contenedor de congelación "Mr. Frosty" de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Nalgene, Rochester, NY). Los viales de células fueron transferidos a nitrógeno líquido por dos días antes de descongelarlos rápidamente en un baño de agua a  $37^\circ\text{C}$ . Se agregaron las células a 10 ml de medio de crecimiento y se centrifugaron antes de que el número de células y la viabilidad se estimasen. Las células fueron sembradas en matraces cubiertos de gelatina a 5000 células por centímetro cuadrado para determinar si las células se adherirían y proliferarían.

**Resultados**

65 La viabilidad inicial de las células a ser conservadas criogénicamente se evaluó con una coloración de tripano azul al 100%. La viabilidad inicial de las células a ser conservadas criogénicamente se evaluó con una coloración de tripano azul al 100%.

Hubo una reducción conmensurada en el número de células con viabilidad para C6295 debido a lisado de células. Las células viables se conservaron criogénicamente en todas las cuatro soluciones adheridas, divididas y producidas en una monocapa confluyente en tres días. No se observó ninguna diferencia distinguible en la tasa de crecimiento estimado.

**Resumen.** La conservación criogénica de células es un procedimiento disponible para la preparación de un banco de células o un producto de células. Cuatro mezclas de conservación criogénica fueron comparadas por su habilidad de proteger a las células derivadas de placenta humana del daño del congelamiento. El medio modificado de Dulbecco de Eagle (DMEM) y el 10% (volumen / volumen) de dimetilsulfóxido (DMSO) es el medio preferido de aquellos comparados para la conservación criogénica de las células derivadas de la placenta.

**EJEMPLO 6**

**Análisis de cariotipos de las células derivadas de postparto**

Las líneas celulares usadas en terapias celulares son preferiblemente homogéneas y libres de cualquier tipo de célula contaminante. Las células usadas en la terapia celular deberán tener números de cromosomas (46) y estructura normales. Para identificar las líneas celulares derivadas de la placenta e umbilicales que son homogéneas y que están libres de células de origen no postparto, se hicieron análisis de cariotipos de muestras celulares.

**Materiales y métodos**

Las PPDCs de tejidos de postparto de neonato masculino fueron cultivados en medios de crecimiento que contenían penicilina / estreptomina. El tejido de postparto de neonato masculino (XY) fue seleccionado para permitir la distinción entre células derivadas neonatales y células derivadas maternas (XX). Las células fueron sembradas a 5000 células por centímetro cuadrado en un medio de crecimiento en un matraz T 25 (Corning, Corning, NY) y se expandieron a un 80% de confluencia. Un matraz T 25 que contenía células fue llenado hasta el cuello con medio de crecimiento. Las muestras fueron entregadas a un laboratorio clínico de citogenética por correo (un transporte de laboratorio a laboratorio con un período estimado de una hora). Las células fueron analizadas durante la metafase cuando los cromosomas se podían visualizar mejor. De 20 células contadas en la metafase, cinco fueron analizadas para un número de cariotipos homogéneos normales (dos). Una muestra celular se caracterizó como homogénea si dos cariotipos estaban presentes. Una muestra celular se caracterizaba como heterogénea si más de dos cariotipos estaban presentes. Células de metafases adicionales fueron contadas y analizadas cuando un número de cariotipo heterogéneo (cuatro) era identificado.

**Resultados**

Se interpretó que todas las muestras celulares enviadas para su análisis cromosómico exhibían una apariencia normal. Tres de las 16 líneas de células analizadas mostraban un fenotipo heterogéneo (XX y XY) indicando la presencia de células derivadas de orígenes neonatal y maternal (Tabla 6 - 1). Las células derivadas del tejido placenta-N fueron aisladas del aspecto neonatal de la placenta. En el pase cero, esta línea celular parecía homogénea XY. Sin embargo, en el pase 9, la línea celular era heterogénea (XX / XY), indicando una presencia previamente no detectada de células de origen maternal.

**Tabla 6-1.** Resultados del análisis de cariotipos de las PPDCs

Tejido	Pase	Células contadas en la metafase	Células analizadas en la metafase	Número de cariotipos	Cariotipo ISCN
Placenta	22	20	5	2	46, XX
Umbilical	23	20	5	2	46, XX
Umbilical	6	20	5	2	46, XY
Placenta	2	20	5	2	46, XX
Umbilical	3	20	5	2	46, XX
Placenta-N	0	20	5	2	46, XY
Placenta-V	0	20	5	2	46, XY
Placenta-M	0	21	5	4	46, XY [18] / 46, XX [3]
Placenta-M	4	20	5	2	46, XX
Placenta-N	9	25	5	4	46, XY [5] / 46, XX [20]
Placenta-N C1	1	20	5	2	46, XY
Placenta-N C3	1	20	6	4	46, XY [2] / 46, XX [18]
Placenta-N C4	1	20	5	2	46, XY
Placenta-N C15	1	20	5	2	46, XY
Placenta-N C20	1	20	5	2	46, XY

Clave: N-aspecto neonatal; V-región con vellosidades; M-aspecto maternal; C-clon

**Resumen.** El análisis cromosómico identificó células derivadas de la placenta y umbilicales cuyos cariotipos parecían normales tal como se interpretó por un laboratorio clínico citogenético. El análisis de cariotipos también identificó líneas de células libres de células maternas, como se determinó por cariotipos homogéneos.

#### EJEMPLO 7

##### Evaluación de marcadores de superficie de células derivadas de postparto humanas por citometría de flujo

La caracterización de las proteínas o "marcadores" de la superficie de las células con citometría de flujo puede utilizarse para determinar la identidad de una línea celular. La consistencia de expresión puede determinarse de donadores múltiples, y en células expuestas a diferentes condiciones de proceso y de cultivo. Las líneas aisladas de células derivadas de postparto (PPDC) de la placenta y umbilicales se caracterizaron (por citometría de flujo), suministrando un perfil para la identificación de estas líneas celulares.

##### Materiales y métodos

**Medios y recipientes de cultivos.** Las células fueron cultivadas en medios de crecimiento (Gibco Carlsbad, CA) con penicilina / estreptomycin. Las células se cultivaron en matraces de cultivos de tejidos T 75, T 150 y T 225 (Corning, Corning, NY) que fueron tratados con plasma hasta su confluencia. Las superficies de crecimiento de los matraces se cubrieron con gelatina al incubar el 2% (masa / volumen) de gelatina (Sigma, St. Louis, MO) durante 20 minutos a la temperatura del cuarto.

**Análisis de coloración de anticuerpos y citometría de flujo.** Las células adherentes en los matraces fueron lavadas en PBS y separadas con tripsina / EDTA. Las células fueron cosechadas, centrifugadas y re-suspendidas en 3% (volumen / volumen) de FBS en PBS con una concentración de células de  $1 \times 10^7$  por mililitro. De acuerdo a las especificaciones del fabricante, se aumentó un anticuerpo al marcador de la superficie de la célula de interés (ver más adelante) a 100  $\mu$ l de suspensión de células y la mezcla fue incubada en la oscuridad durante 30 minutos a 4 °C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para remover los anticuerpos que no estaban vinculados. Las células fueron re-suspendidas en 500 micro litros de PBS y se analizaron con una citometría de flujo. El análisis de citometría de flujo fue realizado con un citómetro FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Se utilizaron los siguientes anticuerpos como marcadores de superficie de células.

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

20 **Comparación entre la placenta y el cordón umbilical.** Se comparó las células derivadas de la placenta con las células derivadas umbilicales en el pase ocho.

**Comparación pase a pase.** Se analizaron las células derivadas de la placenta y umbilicales en los pases 8, 15 y 20.

25 **Comparación donante a donante.** Para comparar las diferencias entre donantes, se compararon entre sí las células derivadas de la placenta de diferentes donantes, y las células derivadas umbilicales de diferentes donantes también se compararon entre sí.

30 **Comparación de cobertura de la superficie.** Los cultivos de células derivadas de la placenta en matraces cubiertos de gelatina fueron comparados a células derivadas de la placenta cultivadas en matraces sin cobertura. Cultivos de células derivadas umbilicales en matraces cubiertos con gelatina fueron comparados a células derivadas umbilicales cultivadas en matraces sin cobertura.

35 **Comparación de enzimas digestivas.** Se utilizaron cuatro tratamientos para el aislamiento y preparación de las células los cuales fueron comparados. Se compararon las células aisladas de la placenta con el tratamiento de 1) colagenasa; 2) colagenasa / dispasa; 3) colagenasa / hialuronidasa; y 4) colagenasa / hialuronidasa / dispasa.

40 **Comparación de capas placentarias.** Las células derivadas del aspecto maternal del tejido placentario se compararon a las células derivadas de la región de vellosa del tejido placentario y a las células derivadas del aspecto neonatal de la placenta.

## Resultados

45 **Comparación placenta versus cordón umbilical.** Las células derivadas de la placenta y umbilicales fueron analizadas con citometría de flujo y mostraron una expresión positiva de CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, indicado por el aumento en los valores de fluorescencia relativa al control IgG. Estas células fueron negativas para una expresión detectable de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, y HLA-DR, DP, DQ, indicado por los valores de fluorescencia comparables al control IgG. Las variaciones en los valores de fluorescencia de las curvas positivas fueron tomadas en cuenta. La media (en otras palabras CD13) y el rango (en otras palabras CD90) de las curvas positivas mostraron alguna variación, pero las curvas parecieron normales, confirmando una población homogénea. Ambas curvas exhibieron individualmente valores mayores que los del control IgG.

55 **Comparación pase a pase - células derivadas de la placenta.** Se analizaron por citometría de flujo a las células derivadas de la placenta en los pases 8, 15, y 20 y todos fueron positivos para la expresión de CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, tal como se reflejó en un aumento en el valor de fluorescencia relativa a la del control IgG. Las células tuvieron una expresión negativa de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, y HLA-DR, DP, DQ teniendo valores de fluorescencia consistentes con los del control IgG.

60 **Comparación pase a pase - células derivadas umbilicales.** Las células derivadas umbilicales en los pases 8, 15 y 20 fueron analizadas con citometría de flujo y todas expresaron CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, indicado por un incremento en la fluorescencia en relación al control IgG. Estas células fueron negativas para CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, y HLA-DR, DP, DQ, indicado por los valores de fluorescencia consistentes con el control IgG.

65 **Comparación donante a donante - células derivadas de la placenta.** Las células derivadas de la placenta aisladas de donantes diferentes fueron analizadas con citometría de flujo y cada una expresó CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, con valores incrementados de fluorescencia relativa a la del control

IgG. Las células fueron negativas en la expresión de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, y HLA-DR, DP, DQ tal como se indicó con un valor de fluorescencia consistente con el del control IgG.

5 **Comparación donante a donante - células derivadas umbilicales.** Las células derivadas umbilicales aisladas de diferentes donantes fueron analizadas por citometría de flujo y cada una mostró una expresión positiva de CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, reflejados en los valores incrementados de fluorescencia relativa en comparación de la del control IgG. Estas células fueron negativas en expresión de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, y HLA-DR, DP, DQ con valores de fluorescencia consistentes con los del control IgG.

10 **El efecto de cubrir la superficie con gelatina en las células derivadas de la placenta.** Las células derivadas de la placenta se expandieron ya sea en matraces cubiertos con gelatina o sin cobertura se analizaron con citometría de flujo y todas expresaron CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, reflejados en los valores incrementados de fluorescencia relativa a la del control IgG. Estas células fueron negativas en expresiones de CD31, CD34, CD45, CD 117, CD141, y HLA-DR, DP, DQ tal como se indicó por los valores de fluorescencia consistentes con los del control IgG.

15 **El efecto de cubrir la superficie con gelatina en las células derivadas umbilicales.** Las células derivadas umbilicales expandidas en matraces con gelatina y sin cobertura se analizaron con citometría de flujo y todas mostraron expresiones positivas de CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, con valores incrementados de fluorescencia relativa al control IgG. Estas células fueron negativas en cuanto a expresiones de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, y HLA-DR, DP, DQ, con valores de fluorescencia consistentes con los del control IgG.

20 **Efectos del procedimiento de digestión enzimática utilizada para la preparación de las células para el perfil del marcador de superficie celular.** Las células derivadas de la placenta aisladas utilizando varias enzimas digestivas analizadas por citometría de flujo expresaron en su totalidad CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, como se indicó por los valores incrementados de fluorescencia relativa en comparación del control IgG. Estas células fueron negativas en expresiones de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, y HLA-DR, DP, DQ como se indicó por los valores de fluorescencia consistentes con los del control IgG.

25 **Comparación de las capas placentarias.** Las células aisladas de las capas maternal, vellida y neonatal de la placenta, respectivamente, analizadas por citometría de flujo mostraron expresiones positivas de CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, como se indica por los valores incrementados de fluorescencia relativa en comparación con el control IgG. Estas células fueron negativas en la expresión de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, y HLA-DR, DP, DQ como se indicó por los valores consistentes de fluorescencia en comparación con el control IgG.

30 **Resumen.** Un análisis de las células derivadas de la placenta y umbilicales con citometría de flujo ha establecido una identidad de estas líneas celulares. Las células derivadas de la placenta y umbilicales son positivas para CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, HLA-A,B,C y negativas para CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR, DP, DQ. Esta identidad fue consistente entre algunas configuraciones de variables incluyendo al donante, el pase, la cobertura de la superficie del envase del cultivo, a las enzimas digestivas y la capa placentaria. Se observaron algunas variaciones en valores fluorescentes individuales de la curva del histograma, medias y rangos, pero todas las curvas positivas bajo todas las condiciones probadas fueron normales y los valores expresados de fluorescencia fueron mayores que en el control IgG, confirmando que las células tienen una población homogénea que tiene una expresión positiva de los marcadores.

## EJEMPLO 8

### 50 Caracterización e inmunohistoquímica de los fenotipos de tejidos de postparto

Los fenotipos de las células encontrados dentro de los tejidos de postparto humanos, específicamente en el cordón umbilical y la placenta, fueron analizados por inmunohistoquímica.

### 55 Materiales y métodos

**Preparación de los tejidos.** Los tejidos humanos del cordón umbilical y de la placenta fueron cultivados y se fijaron en una inmersión en un 4% (masa / volumen) de paraformaldehído durante la noche a 4 °C. Se realizó inmunohistoquímica usando anticuerpos dirigidos en contra de los siguientes epítomos: vimentina (1:500; Sigma, St. Louis, MO), desmina (1: 150, generado contra conejo; Sigma; o 1: 300, generado contra ratón; Chemicon, Temecula, CA), actina de músculo liso alfa (SMA; 1: 400; Sigma), citoqueratina 18 (CK18; 1: 400; Sigma), factor de von Willebrand (vWF; 1: 200; Sigma), y CD34 (CD34 humano de Clase III; 1: 100; Dako, Carpintería, CA). Además, se probaron los siguientes marcadores: GROalpha anti-humano - PE (1: 100; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), anti-humana GCP-2 (1: 100; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), receptor de LDL oxidada anti-humano 1 (ox-LDL R1; 1: 100; Santa Cruz Biotech), y NOGO-A anti-humana (1: 100; Santa Cruz Biotech). Muestras fijadas fueron recortadas con un bisturí y se colocaron dentro del compuesto de adhesión OCT (Tissue-Tek PTU; Sakura,

Torrance, CA) en un baño de hielo seco que contenía etanol. Los bloques congelados fueron seccionados (10 micras de espesor) usando un criostato estándar (Leica Microsystems) y se colocó en portaobjetos de vidrio para su coloración.

5 **Inmunohistoquímica.** La inmunohistoquímica se realizó similarmente a estudios previos (por ejemplo, Messina, et al., 2003, Exper. Neurol. 184: 816-829). Las realizaciones de tejidos fueron lavadas con tampón salino de fosfato (PBS) y expuestos a una solución de bloqueo de proteínas que contenía PBS en un 4% (volumen / volumen) suero de cabra (Chemicon, Temecula, CA), y 0.3 por ciento (volumen / volumen) de Tritón (Triton X-100; Sigma) por una hora para acceder a antígenos intracelulares. En instancias cuando el epítotope de interés estuviese  
10 ubicado en la superficie celular (CD34, ox-LDL R1), se omitió el tritón en todos los pasos del procedimiento para prevenir una pérdida de epítotope. Es más, en instancias cuando el anticuerpo principal era generado en contra de la cabra (GCP-2, ox-LDL R1, NOGO-A), 3% (volumen / volumen) se utilizó suero de burro en vez del suero de cabra durante el procedimiento. Los anticuerpos primarios, diluidos en solución de bloqueo, fueron aplicados en dosis a las  
15 realizaciones por un período de cuatro horas a la temperatura del cuarto. Estas soluciones de anticuerpos primarios fueron removidas, y los cultivos se lavaron con PBS antes de la aplicación de soluciones secundarias de anti cuerpos (una hora a la temperatura del cuarto) que contenía bloqueos. Con IgG de cabra anti ratón - Texas Red (1:250; Molecular Probes (Sondas Moleculares), Eugene, OR) y / o IgG de cabra anti conejo - Alexa 488 (1:250; Molecular Probes (Sondas Moleculares)) o IgG de burro anti cabra - FITC (1:150; Santa Cruz Biotech). Los cultivos fueron lavados, y se aplicó 10 µmol DAPI (Molecular Probes - Sondas Moleculares) durante 10 minutos para  
20 visualizar el núcleo celular.

Después de la inmunotinción, se visualizó la fluorescencia usando el filtro de fluorescencia apropiado en un microscopio epifluorescente invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). Una coloración positiva era representada por una señal fluorescente sobre la coloración del control. Se capturaron imágenes representativas usando una  
25 videocámara digital a color y el software ImagePro (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para muestras triplemente tinturadas, cada imagen fue tomada utilizando un solo filtro de emisión a la vez. Montajes en capas fueron entonces preparados usando el software Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA).

### 30 Resultados

**Caracterización del cordón umbilical.** Los marcadores vimentina, desmina, SMA, CK18, vWF, y CD34 se expresaron en un subconjunto de células encontrado dentro de un cordón umbilical. La expresión de vWF y CD34 en específico estuvieron restringidas a vasos de sangre contenida dentro del cordón. Células CD34+ estaban en la  
35 capa más profunda (lado del lumen). Se encontró una expresión vimentina a lo largo de los compartimientos de la matriz y de sangre en el cordón. Los SMA se limitaron a la matriz y a las paredes externas de la arteria y la vena, pero no se encontraba en los vasos en sí. Se encontraron CK18 y desmina dentro de los vasos exclusivamente, estando la desmina restringida a las capas medias y externas.

**Caracterización de la placenta.** Se observó vimentina, desmina, SMA, CK18, vWF, y CD34 dentro de la placenta y específicamente en ciertas regiones.

**Expresiones de tejidos GROalfa, GCP-2, ox-LDL R1, y NOGO-A.** Ninguno de estos marcadores se observaron dentro de los tejidos de cordón umbilical o de placenta.

45 **Resumen.** Vimentina, desmina, actina de músculo liso-alfa, citoqueratina 18, el factor von Willebrand, y CD 34 se encontraron en las células dentro del cordón umbilical y placenta humanos.

### EJEMPLO 9

#### 50 Análisis de células derivadas de tejido postparto utilizando ensayos de oligonucleótidos

Se utilizaron ensayos con GENECHIP (CHIP GENÉTICO) de Affymetrix para comparar Perfiles de expresión genética de células derivadas umbilicales y de la placenta con fibroblastos, células madre mesénquimas humanas, y otras líneas celulares de médula ósea humana. Este análisis suministró una caracterización de las  
55 células derivadas de postparto e identificó marcadores moleculares únicos para estas células.

#### Materiales y métodos

60 **[0228] Aislamiento y cultivos celulares.** Se obtuvieron cordones umbilicales y placentas humanas del National Disease Research Interchange (NDRI - Intercambio Nacional de Investigación de Enfermedades, Filadelfia, PA) de partos de embarazos a término normal completo con el consentimiento de los pacientes. Los tejidos fueron recibidos y las células fueron aisladas tal como se describe en el Ejemplo 1. Las células se cultivaron en un medio de crecimiento (usando DMEM-LG) en matraces plásticos de cultivos de tejidos cubiertos con gelatina. Los cultivos se incubaron a 37° C con un 5% de CO<sub>2</sub>.

65

Se compraron fibroblastos dérmicos humanos de Cambrex Incorporated (Walkersville, MD; Número de Lote 9F0844) y ATCC CRL-1501 (CCD39SK). Estas dos líneas fueron cultivadas en el medio DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA) con un 10% (volumen / volumen) de suero bovino fetal (Hyclone) y penicilina / estreptomina (Invitrogen). Las células crecieron en plástico tratado para tejidos estándar.

Se compraron células madres mesénquimas humanas (hMSC - Human mesenchymal stem cells) de Cambrex Incorporated (Walkersville, MD; números de lote 2F1655, 2F1656 y 2F1657) y se cultivaron de acuerdo a las especificaciones del fabricante en el medio MSCGM (Cambrex). Las células crecieron en un plástico cultivado de tejidos estándar a 37 °C con un 5% de CO<sub>2</sub>.

Se recibió médula ósea de cresta ilíaca humana de NDRI con el consentimiento del paciente. La médula fue procesada de acuerdo al método señalado por Ho, et al. (WO03/025149). La médula fue mezclada con un amortiguador lisis (155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, y 0.1 mM EDTA, pH 7.2) a una tasa de 1 parte de médula ósea a 20 partes de amortiguador lisis. La suspensión de células fue procesada con un agitador vórtex, incubada por 2 minutos a temperatura ambiente, y centrifugada durante 10 minutos a 500 x g. Los materiales flotantes fueron descartados y el pellet de células fue re - suspendido en el Medio – alfa Esencial Mínimo (Invitrogen) suplementado con un 10% (volumen / volumen) de suero bovino fetal y 4mM de glutamina. Las células se centrifugaron nuevamente y la pellet de células fue re – suspendida en un medio fresco. Las células viables mononucleares fueron contadas usando exclusión de tripano azul (Sigma, St. Louis, MO). Las células mononucleares fueron sembradas en matraces de plástico con cultivos de tejido a 5 x 10<sup>4</sup> células / cm<sup>2</sup>. Las células fueron incubadas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> ya sea a O<sub>2</sub> atmosférico o a 5%. Las células fueron cultivadas durante 5 días sin un cambio de medio. El medio y las células no adheridas se removieron después de 5 días del cultivo. Las células adherentes se mantuvieron en el cultivo.

**Aislamiento de ARNm y Análisis con GENCHIP (CHIP GENÉTICO).** Cultivos de células que crecen activamente fueron removidos de los matraces con un raspador de células en un PBS frío. Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 300 x g. Los materiales flotantes fueron removidos y las células fueron re – suspendidas en PBS fresco y centrifugadas nuevamente. Se removieron los materiales flotantes y el pellet de células fue congelado inmediatamente y almacenado a -80 ° C. Se extrajo ARNm y se transcribió en al ADNc, que fue transcrito entonces a un ARNc y etiquetado como biotina. El ARNc etiquetado biotina fue hibridado con una agrupación de oligonucleótidos HG-U133A GENECHIP (CHIP GENÉTICO) (Affymetrix, Santa Clara CA). La hibridación y la recaudación de datos fueron realizadas de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Los análisis fueron realizados usando el software informático "Significance Analysis of Microarrays" (SAM - "Análisis de Importancia de Micro - Ensayos") versión 1.21 (Stanford University; Tusher, V.G. et al., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 98: 5116-5121).

### Resultados

Catorce poblaciones de células diferentes fueron analizadas. Las células junto con su información de pases, sub-estrato de cultivo, y medio de cultivo se muestran en la Tabla 9 - 1.

**Tabla 9 - 1.** Las células analizadas por el estudio de micro ensayos. Las líneas celulares se listan por código de identificación junto con el pase en e; momento del análisis, crecimiento celular del sub - estrato y crecimiento del medio.

	<b>Población de Células</b>	<b>Pase</b>	<b>Sub - Estrato</b>	<b>Medio</b>
5	Umbiical (022803)	2	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2-ME
	Umbiical (042103)	3	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2-ME
10	Umbiical (071003)	4	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2-ME
	Placenta (042203)	12	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2-ME
	Placenta (042903)	4	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2-ME
15	Placenta (071003)	3	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2-ME
	ICBM (070203) (5% O <sub>2</sub> )	3	Plástico	MEM, 10% FBS
	ICBM (062703) (normal O <sub>2</sub> )	5	Plástico	MEM, 10% FBS
	ICBM (062703) (5% O <sub>2</sub> )	5	Plástico	MEM, 10% FBS
20	hMSC (Lote 2F1655)	3	Plástico	MSCGM
	hMSC (Lote 2F1656)	3	Plástico	MSCGM
	hMSC (Lote 2F 1657)	3	Plástico	MSCGM
25	hFibroblasto (9F0844)	9	Plástico	DMEM-F12, 10% FBS
	hFibroblasto (CCD39SK)	4	Plástico	DMEM-F12, 10% FBS

La información evaluada por un Análisis de Componentes de Principios, analizando 290 genes que fueron diferencialmente expresados en las células. Este análisis permite una comparación relativa de similitudes entre las poblaciones. La Tabla 9 - 2 muestra las distancias euclidianas que fueron calculadas para la comparación de parejas de células. Las distancias Euclidianas se basaron en la comparación de células basadas en 290 genes que fueron diferencialmente expresados en los varios tipos de células. La distancia Euclidiana es inversamente proporcional a la similitud entre la expresión de los 290 genes (en otras palabras, entre más grande sea la distancia, existirá menor similitud).

**Tabla 9 - 2.** Las distancias Euclidianas de parejas de células

	<b>Pareja de Células</b>	<b>Distancia Euclidiana</b>
40	ICBM-hMSC	24.71
	Placenta - Umbilical	25.52
	ICBM - Fibroblasto	36.44
45	ICBM - Placenta	37.09
	Fibroblasto - MSC	39.63
	ICBM - Umbilical	40.15
	Fibroblasto - Umbilical	41.59
50	MSC - Placenta	42.84
	MSC - Umbilical	46.86
	ICBM - Placenta	48.41

Las Tablas 9 - 3, 9 - 4 y 9 - 5 muestran que la expresión de genes se incrementó en las células derivadas de la placenta (Tabla 9 - 3), se incrementó en las células derivadas umbilicales (Tabla 9 - 4), y se redujo en células derivadas umbilicales y de la placenta (Tabla 9 - 5). La columna titulada "Identificación del Conjunto de Sondas" se refiere al código de identificación del fabricante para los conjuntos de sondas de oligonucleótidos ubicadas en un lugar en específico en el chip, que se hibridizan con el gen mencionado (columna "Nombre del Gen"), incluyendo una secuencia que puede encontrarse en la base de datos NCBI (GenBank – Banco Genético) en el número específico de acceso (columna "Número de Acceso NCBI").

65

**Tabla 9 – 3.** Los genes demuestran haber incrementado específicamente su expresión en las células derivadas de la placenta en comparación a los otros ensayos de líneas celulares

<b>Genes incrementados en las células derivadas de la placenta</b>		
<b>Identificación del Grupo de Sondas</b>	<b>Nombre del Gen</b>	<b>Número de Acceso NCBI</b>
209732_at	Lectina tipo C (dominio de reconocimiento de carbohidratos dependientes del calcio), miembro 2 de la superfamilia (inducido a la activación)	AF070642
206067_s_at	Tumor Wilms 1	NM_024426
207016_s_at	Familia de aldehído deshidrogenasa 1, miembro A2	AB015228
206367_at	Renina	NM_000537
210004_at	Receptor 1 (tipo lectina) de lipoproteína oxidada de baja densidad	AF035776
214993_at	Cds parciales, ARNm, IMAGE:4179671 de clon, Homo sapiens,	AF070642
202178_at	Proteína quinasa C, zeta	NM_002744
209780_at	Proteína hipotética DKFZp564F013	AL136883
204135_at	Reducido en cancer de ovario 1	NM_014890
213542_at	ARNm de homo sapiens; ADNc DKFZp547K1113 del clon DKFZp547K1113)	AI246730

**Tabla 9 - 4.** Los que genes muestran haber incrementado específicamente la expresión en las células derivadas umbilicales en comparación con las líneas celulares de otros ensayos

<b>Genes que se incrementaron en las células derivadas umbilicales</b>		
<b>Identificación del Grupo de Sondas</b>	<b>Nombre del Gen</b>	<b>Número de Acceso NCBI</b>
202859_x_at	<i>Interleucina 8</i>	NM_000584
211506_s_at	<i>Interleucina 8</i>	AF043337
210222_s_at	<i>Reticulon 1</i>	BC000314
204470_at	<i>Ligando 1 de quimioquina (motivo C-X-C) (actividad estimuladora del crecimiento de la melanoma)</i>	NM_001511
206336_at	<i>Ligando de quimioquina (motivo C-X-C) 6 (proteína quimiotáctica de granulocitos 2)</i>	NM_002993
207850_at	<i>Ligando de quimioquina (motivo C-X-C) 3</i>	NM_002090
203485_at	<i>Reticulon 1</i>	NM_021136
202644_s_at	<i>Factor de necrosis de tumores, proteína inducida por alfa 3</i>	NM_006290

**Tabla 9 - 5.** Los genes que mostraron una reducción de expresión en las células derivadas umbilicales y placentarias en comparación con los ensayos de las otras líneas celulares

<b>Genes Reducidos en las Células Derivadas Umbilicales y Placentarias</b>		
<b>Identificación del Grupo de Sondas</b>	<b>Nombre del gen</b>	<b>Número de Acceso NCBI</b>
210135_s_at	Homeobox de corta estatura 2	AF022654.1
205824_at	Proteína 27kDa golpe de calor 2	NM_001541.1
209687_at	Ligando de quimioquina (motivo C-X-C) 12 (factor derivado de células estromales 1)	U19495.1
203666_at	Ligando de quimioquina (motivo C-X-C) 12 (factor derivado de células estromales 1)	NM_000609.1
212670_at	Elastina (estenosis aórtica supravulvar, síndrome Williams-Beuren)	AA479278
213381_at	ARNm de homo sapiens; DKFZp586M2022 del ADNc (del clon DKFZp586M2022)	N91149
206201_s_at	Homeo box de mesénquima 2 (homeo box específico que detiene el crecimiento)	NM_005924.1
205817_at	Homólogo homeobox sine oculis 1 (Drosophila)	NM_005982.1
209283_at	Cristalina, alfa B	AF007162.1
212793_at	Activador asociado a morfogénesis no organizada 2	BF513244
213488_at	Proteína DKFZP586B2420	AL050143.1
209763_at	Similar a la neuralina 1	AL049176
205200_at	Tetranectina (proteína de vinculación de plasminógeno)	NM_003278.1
205743_at	Homología src 3 (SH3 - src homology three) y dominio rico en cisteína	NM_003149.1
200921_s_at	Gen de translocación de células B 1, anti-proliferativo	NM_001731.1
206932_at	Hidroxilasa 25 de colesterol	NM_003956.1
204198_s_at	Factor de transcripción relacionado con enanismo 3	AA541630
219747_at	Proteína hipotética FLJ23191	NM_024574.1
204773_at	Receptor de interleucina 11, alfa	NM_004512.1
202465_at	Potenciador de endopeptidasa C de pro - colágeno	NM_002593.2
203706_s_at	Homólogo enrollado 7 (Drosophila)	NM_003507.1
212736_at	Gen hipotético BC008967	BE299456
214587_at	Colágeno, tipo VIII, alfa 1	BE877796

<b>Genes Reducidos en las Células Derivadas Umbilicales y Placentarias</b>		
<b>Identificación del Grupo de Sondas</b>	<b>Nombre del Gen</b>	<b>Número de Acceso NCBI</b>
201645_at	Tenascina C (hexabrachion)	NM_002160.1
210239_at	Proteína homeobox iroquois 5	U90304.1
203903_s_at	Hephaestina	NM_014799.1
205816_at	Integrina, beta 8	NM_002214.1
203069_at	Glicoproteína sináptica de la vesícula 2	NM_014849.1
213909_at	Fis FLJ12280 de ADNc de homo sapiens, clon MAMMA1001744	AU147799
206315_at	Factor similar al receptor de citoquina 1	NM_004750.1
204401_at	Canal activado por la conducción del calcio intermedia / pequeña de potasio, subfamilia N, miembro 4	NM_002250.1
216331_at	Integrina, alfa 7	AK022548.1
209663_s_at	Integrina, alfa 7	AF072132.1
213125_at	Proteína DKFZP586L151	AW007573
202133_at	Coactivador transcripcional con el motivo de vinculación a PDZ (TAZ)	AA081084
206511_s_at	Homólogo de homeobox de oculis sine 2 (Drosophila)	NM_016932.1
213435_at	Proteína KIAA1034	AB028957.1
206115_at	Respuesta temprana de crecimiento 3	NM_004430.1
213707_s_at	Homeo box cercano 5	NM_005221.3
218181_s_at	Proteína hipotética FLJ20373	NM_017792.1
209160_at	familia aldo-ceto reductasa 1, miembro C3 (hidroxiesteroide deshidrogenasa 3-alfa, tipo II)	AB018580.1
213905_x_at	Biblicano	AA845258
201261_x_at	Biblicano	BC002416.1
202132_at	Co - activador transcripcional con motivo vinculante de PDZ (TAZ)	AA081084
214701_s_at	Fibronectina 1	AJ276395.1
213791_at	Proencefalina	NM_006211.1
205422_s_at		NM_004791.1
	integrina, similar a beta-1 (con dominios que se repiten similares a EGF)	
214927_at	ANDc de clon EUROIMAGE 1968422 insertado completamente en ARNm de homo sapiens	AL359052.1
206070_s_at	EphA3	AF213459.1
212805_at	Proteína KIAA0367	AB002365.1
219789_at	Receptor de péptidos natriureticos / Ciclasa de guanilato C (receptor de péptidos antrionatriuréticos C)	AI628360

<b>Genes Reducidos en las Células Derivadas Umbilicales y Placentarias</b>		
<b>Identificación del Grupo de Sondas</b>	<b>Nombre del Gen</b>	<b>Número de Acceso NCBI</b>
219054_at	Proteína hipotética FLJ14054	NM_024563.1
213429_at	ARNm de homo sapiens, ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222)	AW025579
204929_s_at	Proteína de membrana asociada a la vesícula 5 (myobrevin)	NM_006634.1
201843_s_at	Proteína de matriz extracelular similar a la fibulina que contiene EGF 1	NM_004105.2
221478_at	Proteína similar a la 3 que interactúa con BCL2 / adenovirus EB 19kDa	AL132665.1
201792_at	Proteína vinculante de AE 1	NM_001129.2
204570_at	Polipéptido VIIa de oxidase c de citocromo 1 (músculo)	NM_001864.1
201621_at	Neuroblastoma, supresión de tumorosidad 1	NM_005380.1
202718_at	Proteína vinculante del factor de crecimiento similar a la insulina 2, 36kDa	NM_000597.1

Las Tablas 9 - 6, 9 - 7, y 9 - 8 muestran las expresiones de genes que se incrementaron en fibroblastos humanos (Tabla 9 - 6), células ICBM (Tabla 9 - 7), y MSCs (Tabla 9 - 8).

**Tabla 9-6.** Genes que demostraron tener una expresión incrementada de fibroblastos cuando se compararon con otros ensayos de líneas de células.

<b>Genes que se incrementaron en los Fibroblastos</b>	
5	Fosfatasa de especificidad dual 2
	Proteína KIAA0527
	ADNc de homo sapiens: FLJ23224 fis, clon ADSU02206
10	dineína, citoplasmática, polipéptido intermedio 1
	ankyrina 3, nodo de Ranvier (ankyrina G)
	inhibina, beta A (activina A, polipéptido alpha AB de actividad)
15	pirofosfatasa ectonucleotide / fosfodiesterasa 4 (función putativa)
	Proteína KIAA1053
	Proteína asociada con microtúbulos 1A
20	Proteína dedo zinc 41
	Proteína HSPC019
	ADNc de homo sapiens: FLJ23564 fis, clon LNG10773
25	ARNm de homo sapiens; DKFZp564A072 del ADNc (del clon DKFZp564A072)
	Proteína LIM (similar a la proteína enigmática de la rata quinasa C)
	Inhibidor del potenciador de genes polipéptidos de luz kappa en células B, proteína asociada con complejo de quinasa
30	Proteína hipotética FLJ22004
	Secuencia ARNm de humano (clon CTG-A4)
35	ESTs, similares moderadamente al factor similar al receptor de citosina 2; precursor CRL2 del receptor de citosina [homo sapiens]
	Factor de crecimiento transformante, beta 2
	Proteína hipotética MGC29643
40	Antígeno identificado por el anticuerpo monoclonal MRC OX-2
	Proteína putativa de retinopatía ligada al cromosoma X

**Tabla 9-7.** Los genes que mostraron un incremento en la expresión en las células derivadas del ICBM en comparación con ensayos de otras líneas celulares.

<b>Genes incrementados en las células ICBM</b>	
50	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína que se repite en la ankyrina cardiaca</li> <li>• ORF de la región I clase MHC</li> <li>• integrina, alfa 10</li> <li>• proteína hipotética FLJ22362</li> <li>• galactosamina – D – alfa – acetil – N - UDP: acetilgalactosaminiltransferasa - N de polipéptidos 3 (GalNAc-T3)</li> <li>• proteína inducida por interferón-44</li> </ul>
55	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SRY (sex determining region Y - región de Y que determina el sexo)-box 9 (displasia campomélica, reversión sexual autosómica)</li> <li>• proteína asociada con la queratina 1-1</li> <li>• similar a hippocalcin 1</li> <li>• dentado 1 (síndrome de Alagille)</li> <li>• proteoglicano 1, gránulo secretor</li> </ul>
60	

65

**Tabla 9 – 8.** Genes que demostraron haber incrementado la expresión en células MSC cuando se compararon con otros ensayos de líneas celulares.

5	<p><b>Genes incrementados en células MSC</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Interleucina 26</li> </ul>
10	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Maltasa-glucoamilasa (alfa-glucosidasa)</li> <li>• Subfamilia de receptores nucleares 4, grupo A, miembro 2</li> <li>• Homólogo oncogénico viral de osteosarcoma murino v-fos FBJ</li> <li>• Proteína hipotética DC42</li> </ul>
15	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Subfamilia 4 de receptores nucleares, grupo A, miembro 2</li> <li>• Homólogo B oncogénico viral de osteosarcoma murino FBJ</li> <li>• Proteína 1 de la vía de señalización inducible por WNT1</li> </ul>
20	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Secuencia transformable derivada de la línea celular MCF.2</li> <li>• Canal de potasio, subfamilia K, miembro 15</li> <li>• Homeo - proteína de clase emparejada del cartílago 1</li> </ul>
25	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ADNc FLJ12232 fis de homo sapiens, clon MAMMA1001206</li> <li>• ADNc FLJ34668 fis de homo sapiens, clon LIVER2000775</li> </ul>
30	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proto - oncogén jun B</li> <li>• CLL de células B / linfoma 6 (proteína de dedo de cinc 51)</li> <li>• Proteína 36 de dedo de cinc, tipo C3H, homólogo (ratón)</li> </ul>
35	<p><b>Resumen.</b> Ésta examinación fue realizada para suministrar una caracterización molecular de las células de postparto derivadas del cordón umbilical y de la placenta. Este análisis incluyó células derivadas de tres cordones umbilicales y tres placentas diferentes. La examinación también incluyó dos líneas diferentes de fibroblastos dérmicos, tres líneas de células madre mesénquimas, y tres líneas celulares de médula ósea de cresta ilíaca. La ARNm que fue expresada por estas células se analizó en un ensayo oligonucleótido que contenía sondas para 2200 genes. Los resultados mostraron que 290 genes se habían expresado diferencialmente en estos cinco tipos diferentes de células. Estos genes incluyeron 10 genes que se incrementaron específicamente en las células derivadas de la placenta y siete genes se incrementaron específicamente en las células derivadas del cordón umbilical. Se encontraron 54 genes que tuvieron unos niveles de expresión específicamente más bajos en la placenta y el cordón umbilical, cuando se compararon con otros tipos de célula. La expresión de los genes seleccionados ha sido confirmada usando PCR (ver el ejemplo que sigue). Estos resultados demuestran que las células derivadas de postparto tienen un perfil de expresión genético diferente, por ejemplo, si son comparadas con las células y fibroblastos derivados de la médula ósea.</p>
40	<p><b>EJEMPLO 10</b></p> <p><b><u>Marcadores de células en las células derivadas de postparto</u></b></p> <p>En el ejemplo anterior, se evaluaron similitudes y diferencias en las células derivadas de la placenta humana y del cordón umbilical humano al comparar sus perfiles de expresión genética con aquellas células derivadas de otras fuentes (usando un ensayo oligonucleótido). Seis genes “identificadores” fueron reconocidos: receptor LDL oxidado 1, interleucina-ocho, renina, reticulon, ligando de receptor de quimioquina 3 (ligando CXC 3), y proteína quimiotáctica de granulocitos 2 (GCP-2). Estos genes “identificadores” se expresaron en altos niveles relativos en las células derivadas de postparto.</p>
45	<p>Los procedimientos descritos en este ejemplo fueron realizados para verificar la información de micro ensayos y encontrar concordancia / inconformidad entre los genes y las expresiones proteínicas, así como para establecer una serie de ensayos confiables para la detección de identificadores únicos de las células derivadas de la placenta y umbilicales.</p>
50	<p><b><u>Métodos y Materiales</u></b></p>
55	
60	
65	

**Células.** Células derivadas de la placenta (tres aislamientos, incluyendo uno predominantemente neonatal como se identificó con el análisis de cariotipos), células derivadas umbilicales (cuatro aislamientos), y fibroblastos dérmicos normales humanos (NHDF; neonatales y adultos) cultivados en medios de crecimiento con penicilina / estreptomycin en un matraz T 75 cubierto con gelatina. Células madres mesénquimas (MSCs) se cultivaron en un Medio de Crecimiento de Células Madres Mesénquimas de un equipo Bullet (MSCGM - Mesenchymal Stem Cell Growth Medium; Cambrex, Walkerville, MD).

Para el protocolo IL-8, las células fueron descongeladas del nitrógeno líquido y puestas en platos en matraces cubiertos con gelatina a 5000 células por centímetro cuadrado, cultivadas durante 48 horas en el medio de crecimiento y entonces cultivadas durante ocho horas más en 10 ml de medio de privación de suero [DMEM -de baja glucosa (Gibco, Carlsbad, CA), penicilina / estreptomycin (Gibco, Carlsbad, CA) y 0.1% (masa / volumen) de albúmina de suero bovino (BSA; Sigma, St. Louis, MO)]. Después de este tratamiento el ARN fue extraído y el material flotante fue centrifugado a 150 x g durante cinco minutos para remover los vestigios celulares. El material flotante fue congelado entonces a -80 °C para un análisis ELISA.

**Cultivo de células para el ensayo ELISA.** Las células de postparto derivadas de la placenta y umbilicales, así como los fibroblastos humanos derivados de prepucios neonatales humanos se cultivaron en un medio de crecimiento en matraces T 75 cubiertos de gelatina. Las células se congelaron en el paso 11 en nitrógeno líquido. Las células se descongelaron y se transfirieron a tubos de centrifugación de 15 ml. Después de la centrifugación a 150 x g durante cinco minutos, el material flotante fue descartado. Las células fueron re - suspendidas en un medio de cultivo de 4 ml y entonces contadas. Las células se cultivaron en un matraz de 75 cm<sup>2</sup> que contenía 15 ml del medio de crecimiento a 375.000 células por frasco durante 24 horas. El medio fue cambiado a un medio de privación de suero por ocho horas. El medio de privación de suero fue recolectado al final de la incubación, centrifugado a 14.000 x g durante cinco minutos (y almacenado a -20 °C).

Para estimar el número de células en cada matraz, se agregó 2 ml de tripsina / EDTA (Gibco, Carlsbad, CA) a cada matraz. Después de que las células se separaron del matraz, la actividad de la tripsina se neutralizó con 8 ml del medio de crecimiento. Las células se transfirieron a un tubo de centrifugación de 15 ml 150 x g durante cinco minutos. El material flotante fue removido y se agregó 1 ml de medio de crecimiento a cada tubo para re - suspender las células. El número de células se estimó usando un hemocitómetro.

**Ensayo ELISA.** La cantidad de IL-8 secretado por las células al medio de privación de suero fue analizado usando ensayos ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN). Todos los ensayos fueron probados de acuerdo a las instrucciones provistas por el fabricante.

**Aislamiento total ARN.** Se extrajo el ARN de las células derivadas de postparto y fibroblastos que eran confluentes para la expresión IL-8 de las células tratadas como se describió anteriormente. Las células fueron lisadas con 350 µl de amortiguador RLT que contenían mercaptoetanol beta (Sigma, St. Louis, MO) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit (botiquín); Qiagen, Valencia, CA). Se extrajo el RM de acuerdo a las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit (Botiquín); Qiagen, Valencia, CA) y sujeto al tratamiento DNase (2.7 unidades por muestra) (Sigma St. Louis, MO). El ARN fue eluido con 50 µl de agua tratada con DEPC y almacenada a -80 °C.

**Transcripción reversa.** También se extrajo ARN de placenta y tejido umbilical humano. El tejido (30 mg) fue suspendido en 700 µl de amortiguador RLT que contenían 2- mercaptoetanol. Las muestras se homogenizaron mecánicamente y el ARN fue extraído de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se extrajo el ARN con 50 µl de agua tratada con DEPC y almacenada a -80° C. El ARN fue transcrito en reversa usando hexámeros aleatorios con los reactivos de transcripción en reversa de TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA) a 25 °C durante 10 minutos, 37 °C durante 60 minutos, y 95 °C durante 10 minutos. Las muestras fueron almacenadas a -20 °C.

Los genes identificados por los micro ensayos ADNc como regulados solamente en las células de postparto (genes de identificación - incluyendo receptores LDL oxidados, interleucina - 8, renina y reticulon), fueron investigados en mayor detalle usando PCR en tiempo real y convencional.

**PCR en tiempo real.** Se realizaron PCRs de muestras ADNc usando productos de expresión genética Assays-on-Demand™ (Ensayos-cuando éstos sean Requeridos): se mezcló el receptor LDL oxidado (Hs00234028); renina (Hs00166915); reticulon (Hs00382515); ligando CXC 3 (Hs00171061); GPC-2(Hs00605742); IL-8 (Hs00174103); y GAPDH (Applied Biosystems, Foster City, CA) con ADNc y la mezcla maestra TaqMan Universal PCR de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando un sistema de detección de secuencia 7000 con un software ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las condiciones térmicas del ciclo fueron inicialmente 50° C durante dos minutos y 95° C durante 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95° C durante 15 segundos y 60° C durante un minuto. La información PCR fue analizada de acuerdo a las especificaciones del fabricante (boletín del usuario número dos de Applied Biosystems para el sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700).

**PCR convencional.** Se realizó un PCR convencional usando un ABI PRISM 7700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Boston, Massachusetts, EE.UU.) para confirmar los resultados del PCR en tiempo real. El PCR fue realizado usando 2 µl de solución de ADNc, 1 x amortiguador de reacción PCR mixta universal AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA) y una desnaturalización inicial a 94° C durante cinco minutos. La amplificación fue optimizada para cada conjunto inicializador. Para IL-8, ligando CXC 3, y el reticulon (94° C durante 15 segundos, 55 °C durante 15 segundos y 72° C durante 30 segundos durante los 30 ciclos); para la renina (94° C durante 15 segundos, 53 °C durante 15 segundos y 72° C durante 30 segundos para 38 ciclos); para el receptor LDL oxidado y GAPDH (94° C durante 15 segundos, 55° C durante 15 segundos y 72° C durante 30 segundos por 33 ciclos). Los inicializadores utilizados para la amplificación se listan en la tabla 1. La concentración de inicializador en la reacción PCR final fue 1 µmol excepto para GAPDH, que fue de 0.5 micro moles. Los inicializadores de GAPDH fueron los mismos que para la reacción PCR en tiempo real, excepto que la sonda del fabricante de TaqMan no se agregó a la reacción final PCR. Se corrieron muestras en [249] 2% (masa / volumen) de gel agarosa y tinturado con bromuro de etidio (Sigma, St. Louis, MO). Las imágenes fueron capturadas utilizando un rollo de película 667 Universal Twinpack (Paquete Gemelo Universal) (VWR International, South Plainfield, NJ) usando una cámara Polaroid de longitud focal (VWR International, South Plainfield, NJ).

**Tabla 10-1:** Inicializadores utilizados

Nombre del Inicializador	Inicializador	
Receptor LDL oxidado	S: 5'-GAGAAATCCAAAGAGCAAATGG-3'	(NUM. DE ID DE SEQ.:1)
	A: 5'-AGAATGGAAAAGTGAATAGG-3'	(NUM. DE ID DE SEQ.:2)
Renina	S: 5'-TCTTCGATGCTTCGGATTCC-3'	(NUM. DE ID DE SEQ.:3)
	A: 5'-GAATTCTCGGAATCTCTGTTG-3'	(NUM. DE ID DE SEQ.:4)
Reticulon	S: 5'- TTACAAGCAGTGCAGAAAACC-3'	(NUM. DE ID DE SEQ.:5)
	A: 5'- AGTAAACATTGAAACCACAGCC-3'	(NUM. DE ID DE SEQ.:6)
Interleucina - 8	S: 5'- TCTGCAGCTCTGTGTGAAGG-3'	(NUM. DE ID DE SEQ.:7)
	A: 5'-CTTCAAAAACCTTCTCCACAACC- 3'	(NUM. DE ID DE SEQ.:8)
Ligando de quimioquina (CXC) 3	S: 5'- CCCACGCCACGCTCTCC-3'	(NUM. DE ID DE SEQ.:9)
	A: 5'-TCCTGTCTCAGTTGGTGCTCC -3'	(NUM. DE ID DE SEQ.:10)

**Inmunofluorescencia.** Las PPDCs fueron fijadas con un 4% (masa / volumen) de paraformaldehído frío (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 10 minutos a la temperatura del cuarto. Se utilizó un aislamiento de células derivadas umbilicales y otro de células derivadas de la placenta en el pase 0 (P0) (directamente después de su aislamiento) y en el pase 11 (P 11) (dos aislamientos de células derivadas de la placenta y dos aislamientos de células derivadas umbilicales) y fibroblastos (P 11). La inmunocitoquímica se realizó usando los anticuerpos dirigidos en contra de los siguientes epítopes: vimentina (1:500; Sigma, St. Louis, MO), desmina (1:150; Sigma - generado en contra del conejo; o 1:300; Chemicon, Temecula, CA -generado en contra del ratón), actina de músculo liso alpha (SMA; 1:400; Sigma Citoqueratina 18 (CK18; 1:400; Sigma), factor von Willebrand (vWF; 1:200; Sigma), y CD34 (CD34 humano clase III; 1:100; DAKOCytomation, Carpinteria, CA). Adicionalmente, se probaron los siguientes marcadores en las células postparto del pase 11: GRO alpha - PE anti humano (1:100; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), GCP-2 anti humano (1:100; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), receptor LDL oxidado anti humano 1 (ox-LDL R1; 1:100; Santa Cruz Biotech), y NOGA-A anti humano (1:100; Santa Cruz, Biotech).

Los cultivos fueron lavados con tampón fosfato salino (PBS) y fueron expuestos a una solución de bloqueo de proteínas que contenía PBS, 4% (volumen / volumen) de suero de cabra (Chemicon, Temecula, CA), y 0.3 % (volumen / volumen) de Tritón (Triton X-100; Sigma, St. Louis, MO) durante 30 minutos para acceder a antígenos intracelulares. En los lugares donde se ubicaba el epítipo de interés en la superficie celular (CD34,ox-LDL R1) se omitía el Tritón X-100 en todos los pasos del procedimiento para prevenir una pérdida de epítipo. Es más, en instancias donde el anticuerpo principal fue generado en contra de la cabra (GCP-2, ox-LDL R1, NOGO-A), se utilizaba un 3% (volumen / volumen) de suero de burro en lugar del suero de cabra durante ese proceso. Los anticuerpos primarios, diluidos en la solución de bloqueo, se aplicaron entonces a los cultivos por un período de una hora a la temperatura del cuarto. Las principales soluciones de anticuerpos se removieron y los cultivos fueron lavados con PBS antes de la creación de soluciones secundarias de anticuerpos (una hora a la temperatura del cuarto) que contenía bloqueos junto con IgG de cabra anti ratón Texas Red (1:250; Molecular Probes (Sondas Moleculares), Eugene, OR) y / o IgG de cabra anti conejo - Alexa 488 (1:250; Molecular Probes - Sondas Moleculares) o IgG burro anti cabra - FITC (1:150, Santa Cruz Biotech). Los cultivos fueron lavados y se aplicó 10 µmol de DAPI (Molecular Probes - Sondas Moleculares) durante 10 minutos para visualizar el núcleo de la célula.

Después de la inmunotinción, la fluorescencia se visualizó usando un filtro apropiado de fluorescencia en un microscopio fluorescente – epi invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). En todos los casos, una coloración positiva representaba una señal de fluorescencia por sobre el tinte de control mientras se seguía completamente el procedimiento señalado anteriormente con excepción de la aplicación de una solución primaria de anticuerpos. Se capturaron imágenes representativas usando una videocámara a color digital y por medio del software ImagePro (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para muestras con tres colores, cada imagen fue tomada usando sólo un filtro

de emisión a la vez. Las capas de montajes fueron preparadas posteriormente usando el software Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA).

**Preparación de células para análisis FACS.** Las células adheridas en los matraces fueron lavadas con tampón fosfato salino (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) y separadas con tripsina / EDTA (Gibco, Carlsbad, CA). Las células fueron cosechadas, centrifugadas, y re - suspendidas con un 3% (volumen / volumen) de FBS en PBS a una concentración celular de  $1 \times 10^7$  por mililitro. Se entregaron dosis de 100  $\mu$ l a tubos cónicos. Las células tinturadas para antígenos intracelulares fueron permeabilizadas con el tampón Perm / Wash (BD Pharmingen, San Diego, CA). Se agregaron anticuerpos a las dosis de acuerdo a las especificaciones de los fabricantes y las células fueron incubadas en la oscuridad durante 30 minutos a 4 °C. Después de la incubación, las células fueron lavadas con PBS y centrifugadas para remover los anticuerpos que estaban en exceso. Las células que requerían un anticuerpo secundario fueron re - suspendidas en 100  $\mu$ l de un 3% de FBS. Se añadió el anticuerpo secundario de acuerdo a las especificaciones de los fabricantes y las células fueron incubadas en la oscuridad durante 30 minutos a 4 °C. Después de la incubación, las células fueron lavadas con PBS y centrifugadas para remover el exceso de anticuerpos secundarios. Las células lavadas fueron re - suspendidas en 0.5 mililitros de PBS y analizadas por citometría de flujo. Los siguientes fueron los anticuerpos utilizados: receptor LDL oxidado 1(sc-5813; Santa Cruz, Biotech), GROa (555042; BD Pharmingen, Bedford, MA), IgG1 de ratón kappa, (P-4685 y M-5284; Sigma), IgG burro contra cabra (sc-3743; Santa Cruz, Biotech.). Se realizó el análisis de citometría de flujo con FACScalibur (Becton Dickinson San Jose, CA).

**Resultados**

Los resultados PCR en tiempo real para los genes “identificadores” seleccionados realizados en el ADNc de células derivadas de placenta humana, fibroblastos adultos y neonatales y las células madre mesénquimas (MSCs) indican que el receptor LDL oxidado y la renina fueron expresados a un nivel más alto en las células derivadas de la placenta en comparación con las otras células. La información obtenida del PCR en tiempo real fue analizada por el método  $\Delta\Delta CT$  y se expresó en una escala logarítmica. Los niveles de expresión del reticulon y del receptor LDL oxidado fueron más altos en células derivadas umbilicales cuando se compararon con otras células. No existía diferencia significativa en la expresión de los niveles de ligando CXC 3 y GPC-2 entre las células derivadas de postparto y los controles. Los resultados del PCR en tiempo real fueron confirmados por los PCR convencionales. La secuenciación de productos PCR dieron mayor validez a estas observaciones. No se encontró diferencia significativa en el nivel de expresión de ligando CXC 3 entre las células derivadas de postparto y los controles usando los iniciadores ligando CXC 3 PCR listados anteriormente.

La producción de citoquina, IL-8 en postparto o fue elevada en las células derivadas de postparto cultivadas en los medios de crecimiento y las que fueron privadas de sueros. Todos los datos PCR en tiempo real fueron validados con PCR convencionales y con secuenciación de productos PCR.

Cuando los materiales flotantes de células que crecieron en el medio libre de sueros se examinaron para determinar la presencia de IL-8, las cantidades más altas fueron detectados en medios derivados de células umbilicales y en algunos aislamientos de células placentarias (Tabla 10 - 1) no se detectó ningún IL-8 en medios derivados de fibroblastos dérmicos humanos.

**Tabla 10-1:** Cantidades de la proteína IL-8 medidos por ELISA

Tipo de Célula	IL-8
hFibro	ND
Aislamiento de placenta 1	ND
Aislamiento umbilical 1	2058.42 ± 144.67
Aislamiento de placenta 2	ND
Aislamiento umbilical 2	2368.86 ± 22.73
Aislamiento de placenta 3 (normal O <sub>2</sub> )	17.27 ± 8.63
Aislamiento de placenta 3 (bajo O <sub>2</sub> , con O BME)	264.92 ± 9.88
<b>Los resultados del ensayo ELISA para interleucina-8 (IL-8) realizado en las células derivadas de la placenta y umbilicales así como en fibroblastos de piel humana. Los valores presentados aquí son picogramos / millones de células, n = 2, sem.</b>	
<b>ND: No Detectado</b>	

Las células derivadas de la placenta también se examinaron para detectar la producción del receptor LDL oxidado, GCP-2 y GROalfa por medio de un análisis FACS. Las células fueron positivas para GCP-2. El receptor LDL oxidado y el GRO no fueron detectados por este método.

5 Las células derivadas de la placenta también fueron examinadas para detectar la producción de ciertas proteínas por el análisis inmunocitoquímico. Inmediatamente después del aislamiento (pase cero), las células derivadas de la placenta humana fueron fijadas con 4% de paraformaldehído y se expusieron a anticuerpos para analizar seis proteínas: el factor von Willebrand, CD34, citoqueratina 18, desmina, actina de músculo liso alfa y vimentina. Las células marcaron positivo para actina de músculo liso alfa y vimentina. Esta tendencia se preservó hasta el pase 11. Sólo unas pocas células (menos del 5%) en el pase cero marcaron positivo para citoqueratina 18

10 Las células derivadas del cordón umbilical humano en el pase cero fueron analizadas para detectar la producción de ciertas proteínas con un análisis inmunocitoquímico. Inmediatamente después del aislamiento (pase cero), las células fueron fijadas con un 4% de paraformaldehído y expuestas a anticuerpos para analizar seis proteínas: factor von Willebrand, CD34, citoqueratina 18, desmina, actina de músculo liso alfa, y vimentina. Las células derivadas umbilicales fueron positivas para actina de músculo liso alpha y vimentina, con la tendencia de coloración consistente hasta el pase 11.

15 **Resumen.** Se estableció concordancia entre los niveles de expresión genética medidos por micro ensayos y PCR (ambas en tiempo real y convencional) para cuatro genes: receptor LDL oxidado 1, rennina, reticulon, y IL-8. La expresión de estos genes fue regulada diferencialmente a nivel de ARNm en los PPDCs, con IL-8 también regulado diferencialmente a nivel proteínico. La presencia del receptor LDL oxidado no fue detectada a nivel proteínico por el análisis FACS en las células derivadas de la placenta. La expresión diferencial de GCP-2 y del ligando CXC 3 no fue confirmada a nivel de ARNm, sin embargo se detectó GCP-2 a nivel proteínico por el análisis FACS en las células derivadas de la placenta. Aunque este resultado no se refleja por los datos obtenidos originalmente del experimento de micro ensayos, esto puede deberse a una diferencia en la sensibilidad de las metodologías.

20 Inmediatamente después del aislamiento (pase cero), las células derivadas de la placenta humana marcaron positivas para actina de músculo liso alfa y vimentina. Esta tendencia también se observó en las células en el pase 11. Estos resultados sugieren que la expresión de vimentina y de actina de músculo liso alfa pueden preservarse en células con pases, en el medio de crecimiento y bajo las condiciones utilizadas en estos procedimientos. Las células derivadas del cordón umbilical humano en el pase cero fueron sondeadas por expresiones de actina de músculo liso alfa y vimentina y ambas marcaron positivo. La tendencia de marcación fue preservada hasta el pase 11.

## EJEMPLO 11

### Evaluación inmunológica in vitro de las células derivadas de postparto

40 Las células derivadas de postparto (PPDCs) fueron evaluadas in vitro por sus características inmunológicas como un esfuerzo para predecir la respuesta inmunológica, si existiese, que estas células provocarían después de un trasplante in vivo. Las PPDCs fueron ensayadas con simetría de flujo por la presencia de HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86, y B7-H2. Estas proteínas se expresan por células que presentan antígenos (APC) y son requeridas para la estimulación directa a de células naïve CD4\*<sup>T</sup> (Abbas & Lichtman, CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY (INMUNOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR), 5ta Ed. (2003) Saunders, Filadelfia, pg. 171). Las líneas celulares también fueron analizadas por citometría de flujo para la expresión de HLA-G (Abbas & Lichtman, 2003, supra), CD 178 (Coumans, et al., (1999) Journal of Immunological Methods (Revista de Métodos Inmunológicos) 224, 185-196), y PD-L2 (Abbas & Lichtman, 2003, supra; Brown, et. al. (2003) The Journal of Immunology (La Revista de Inmunología) 170, 1257-1266). Se piensa que la expresión de estas proteínas por las células que residen en los tejidos placentarios regulan el estatus inmunoprivilegiado de los tejidos en los radios en el útero. Para predecir la medida en la cual las líneas celulares derivadas de la placenta y umbilicales provocan una respuesta in vivo, las líneas celulares fueron probadas en una reacción en una sola reacción mixta de linfocitos (MLR).

### Materiales y Métodos

55 **Cultivo celular.** Las células fueron cultivadas hasta la confluencia en medios de crecimiento con penicilina / estreptomycin en matraces T 75 (Corning, Corning, NY) cubiertos con 2% de gelatina (Sigma, St. Louis, MO).

60 **Tinción de cuerpos.** Las células fueron lavadas en tampón fosfato salino (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) y fueron separados con tripsina / EDTA (Gibco, Carlsbad, MO). Las células fueron cultivadas, centrifugadas y re-suspendidas en un 3% (volumen / volumen) de FBS en PBS a una concentración celular de  $1 \times 10^7$  por mililitro. Se añadieron anticuerpos (Tabla 11 - 1) a 100  $\mu$ l de suspensión celular de acuerdo a las especificaciones del fabricante y se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos a 4° C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS

y se centrifugaron para remover anticuerpos no unidos. Las células fueron re-suspendidas en 500 µl de PBS y analizadas con citometría de flujo usando un instrumento FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA).

**Tabla 11-1. Anticuerpos**

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

**Reacción Mixta de Linfocitos.** Matrices conservados criogénicamente en el pase 10 de células derivadas umbilicales marcadas como línea celular A y de pase 11 de células derivadas de la placenta marcadas como línea celular B fueron enviadas en hielo seco a CTBR (Senneville, Quebec) para realizar una reacción mixta de linfocitos usando CTBR SOP No. CAC-031. Las células mononucleares de la sangre periférica (PBMCs - Peripheral blood mononuclear cells) fueron recolectadas de varios donantes masculinos y femeninos. Los estimuladores (donadores) alogénicos PBMC, autólogos PBMC, y líneas celulares de postparto fueron tratadas con mitomicina C. Las células autólogas y estimuladoras tratadas con mitomicina C fueron agregadas las PBMCs respondedoras (recipientes) y cultivadas durante 4 días. Después de la incubación se agregó [3H]timidina a cada muestra y se cultivaron por 18 horas. Después de cosechar las células, ADN radiomarcado fue extraído, y se midió la incorporación de [3H]-timidina usando un contador de tinción.

El índice de estimulación de los donantes alogénicos (SIAD - stimulation index for the allogeneic donor) se calculó como la proliferación media del destinatario más el donante alogénico tratado con mitomicina C dividido para la proliferación de la línea base del destinatario. El índice de estimulación de las PPDCs se calculó como la proliferación media del destinatario más la línea celular de postparto tratada con mitomicina C dividida para la proliferación de la línea base del receptor.

**Resultados**

**Reacción mixta de linfocitos - células derivadas de la placenta.** Siete donantes humanos de sangre voluntarios fueron estudiados para identificar a un sólo donante alogénico que exhibiese una respuesta robusta de proliferación en una reacción mixta de linfocitos con los otros seis donantes. Este donante fue seleccionado como el donante alogénico positivo de control. Los otros seis donadores de sangre fueron seleccionados como destinatarios. El donante alogénico positivo de control y las líneas celulares derivadas de la placenta fueron tratados con mitomicina C y cultivados en una reacción mixta de linfocitos con los seis receptores alogénicos individuales. Las reacciones fueron realizadas por triplicado usando dos platos de cultivos celulares con tres receptores por plato (Tabla 11-2). El índice de estimulación promedio varió desde 1.3 (plato 2) hasta 3 (plato 1) y los controles alogénicos del donante positivo variaron desde 46.25 (plato 2) hasta 279 (plato 1) (Tabla 11-3).

**Tabla 11-2.** Datos de la reacción mixta de linfocitos - línea celular B (placenta)

DPM para ensayo de proliferación									
5									
Identificación del Plato: Plato 1									
10	Analítico	Cultivo		Réplicas					
	Número	Sistema		1	2	3	Media	SD	cv
15	IM03-7769	Proliferación de la línea base del receptor		79	119	138	112	30.12	26.9
20		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)		241	272	175	229.3	49.54	21.6
25		Donante alogénico MLR IM03-7768 (tratado con mitomicina C)		23971	22352	20921	22414.7	1525.97	6.8
		MLR con línea celular (celula tipo B tratada con mitomicina C)		664	559	1090	771	281.21	36.5
	SI (donante)						200		
30	SI (línea celular)						7		
35	IM03-7770	Proliferación de la línea base del receptor		206	134	262	200.7	64.17	32
40		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)		1091	602	524	739	307.33	41.6
45		Donante alogénico MLR IM03-7768 (tratado con mitomicina C)		45005	43729	44071	44268.3	660.49	1.5
		MLR con línea celular (celula tipo B tratada con mitomicina C)		533	2582	2376	1830.3	1128.24	61.6
	SI (donante)						221		
50	SI (línea celular)						9		
55	IM03-7771	Proliferación de la línea base del receptor		157	87	128	124	35.17	28.4
60		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)		293	138	508	313	185.81	59.4
		Donante alogénico MLR IM03-7768 (tratado con mitomicina C)		24497	34348	31388	30077.7	5054.53	16.8
65		MLR con línea celular (celula tipo B tratada con mitomicina C)		601	643	a	622	29.7	4.8
	SI(donante)						243		

ES 2 600 555 T3

5	Analítico	Cultivo	Réplicas			Media	SD	cv
	Número	Sistema	1	2	3			
	SI (línea celular)					5		
10	IM03-7772	Proliferación de la línea base del receptor	56	98	51	68.3	25.81	37.8
		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	133	120	213	155.3	50.36	32.4
15		Donante alogénico MLR IM03-7768 (tratado con mitomicina C)	14222	20076	22168	18822	4118.75	21.9
20		MLR con línea celular (celula tipo B tratada con mitomicina C)	a	a	a	a	a	a
	SI(donante)					275		
	SI (línea celular)					a		
25								
30	IM03-7768 (Donante alogénico)	Proliferación de la línea base del receptor	84	242	208	178	83.16	46.7
		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	361	617	304	427.3	166.71	39
35	Línea celular tipo B	Proliferación de la línea base del receptor	126	124	143	131	10.44	8
		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	822	1075	487	794.7	294.95	37.1
40								
	Identificación del Plato: Plato 2							
45	Número analítico	Sistema de Cultivo	Réplicas			Media	SD	CV
			1	2	3			
50	IM03-7774	Proliferación de la línea base del receptor	908	181	330	473	384.02	81.2
		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	269	405	572	415.3	151.76	36.5
55		Donante alogénico MLR IM03-7768 (tratado con mitomicina C)	29151	28691	28315	28719	418.7	1.5
60		MLR con línea celular (celula tipo B tratada con mitomicina C)	567	732	905	734.7	169.02	23
65	SI(donante)					61		

ES 2 600 555 T3

Identificación del Plato: Plato 2										
5	Número analítico	Sistema de Cultivo	Réplicas			Media	SD	CV		
			1	2	3					
	SI (línea celular)					2				
10	IM03-7774	Proliferación de la línea base del receptor	893	1376	185	818.0	599.03	73.2		
15		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	261	381	568	403.3	154.71	38.4		
20		Donante alogénico MLR IM03-7768 IM03-7768 (tratado con mitomicina C)	53101	42839	48283	48074.3	5134.18	10.7		
		MLR con línea celular (celula tipo B tratada con mitomicina C)	515	789	294	532.7	247.97	46.6		
	SI (donante)					59				
25	SI (línea celular)					1				
30	IM03-7775	Proliferación de la línea base del receptor	1272	300	544	705.3	505.69	71.7		
35		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	232	199	484	305.0	155.89	51.1		
40		Donante alogénico MLR IM03-7768 IM03-7768 (tratado con mitomicina C)	23554	10523	28965	21014.0	9479.74	45.1		
		MLR con línea celular (celula tipo B tratada con mitomicina C)	768	924	563	751.7	181.05	24.1		
	SI (donante)					30				
	SI (línea celular)					1				
45	IM03-7776	Proliferación de la línea base del receptor	1530	137	1046	904.3	707.22	78.2		
50		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	420	218	394	344.0	109.89	31.9		
55		Donante alogénico MLR IM03-7768 IM03-7768 (tratado con mitomicina C)	28893	32493	34746	32044.0	2952.22	9.2		
		MLR con línea celular (celula tipo B tratada con mitomicina C)	a	a	a	a	a	a		
	SI (donante)					35				
	SI (línea celular)					a				

60

65

**Tabla 11-3.** Índice de estimulación promedio de las células de la placenta y de un donante alogénico en una reacción mixta de linfocitos con seis receptores alogénicos

Índice promedio de estimulación		
	Receptor	Placenta
Plato 1 (Receptores 1 - 3)	279	3
Plato 2 (Receptores 4 - 6)	46.25	1.3

**Reacción mixta de linfocitos - células derivadas umbilicales.** Se examinaron a seis donantes de sangre humanos para identificar a un solo donante alogénico que exhibiese una respuesta robusta de proliferación en una reacción mixta de linfocitos en comparación de los otros cinco donadores de sangre. Este donador fue seleccionado como el donante alogénico positivo de control. Los otros cinco donantes de sangre fueron seleccionados como receptores. El donante alogénico positivo de control y las líneas celulares de placenta fueron tratadas con mitomicina C y cultivadas en una reacción mixta de linfocitos con los cinco receptores alogénicos. Las reacciones fueron realizadas en triplicado usando dos platos de cultivos celulares con tres receptores por plato (Tabla 11 - 4). El índice de estimulación promedio varió entre 6.5 (plato 1) a 9 (plato 2) y los controles alogénicos del donante positivo variaron de 42.75 (plato 1) a 70 (plato 2) (Tabla 11 - 5).

**Tabla 11 - 4.** Datos de la Reacción Mixta de Linfocitos – Línea Celular A (Umbilical)

DPM para el Ensayo de Proliferación									
Identificación del Plato: Plato 1									
Número Analítico	Sistema de Cultivo	Réplicas			Media	SD	CV		
		1	2	3					
IM04-2478	Proliferación de la línea base del receptor	1074	406	391	623.7	390.7	62.5		
	Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	672	510	1402	861.3	475.19	55.2		
	Donante alogénico MLR IM04-2477 (tratado con mitomicina C)	43777	48391	38231	43466.3	5087.12	11.7		
	MLR con línea celular (célula tipo A tratada con mitomicina C)	2914	5622	6109	4881.7	1721.36	35.3		
SI (donante)					70				
SI (línea celular)					8				

	Número Analítico	Sistema de Cultivo	Réplicas			Media	SD	CV
			1	2	3			
5	IM04-2479	Proliferación de la línea base del receptor	530	508	527	521.7	11.93	2.3
10		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	701	567	1111	793	283.43	35.7
15		Donante alogénico MLR IM04-2477 (tratado con mitomicina C)	25593	24732	22707	24344	1481.61	6.1
20		MLR con línea celular (celula tipo A tratada con mitomicina C)	5086	3932	1497	3505	1832.21	52.3
	SI (donante)					47		
	SI (línea celular)					7		
	Número Analítico	Sistema de Cultivo	Réplicas			Media	SD	CV
25	IM04-2480	Proliferación de la línea base del receptor	1192	854	1330	1125.3	244.9	21.8
30		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	2963	993	2197	2051	993.08	48.4
35		Donante alogénico MLR IM04-2477 (tratado con mitomicina C)	25416	29721	23757	26298	3078.27	11.7
40		MLR con línea celular (celula tipo A tratada con mitomicina C)	2596	5076	3426	3699.3	1262.39	34.1
	SI (donante)					23		
	SI (línea celular)					3		
45	IM04-2481	Proliferación de la línea base del receptor	695	451	555	567	122.44	21.6
50		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	738	1252	464	818	400.04	48.9
55		Donante alogénico MLR IM04-2477 (tratado con mitomicina C)	13177	24885	15444	17835.3	6209.52	34.8
60		MLR con línea celular (celula tipo A tratada con mitomicina C)	4495	3671	4674	4280	534.95	12.5
	SI (donante)					31		
	SI (línea celular)					8		

ES 2 600 555 T3

5	Número Analítico	Sistema de cultivo	Réplicas						
			1	2	3		Media	SD	CV
10	IM04-2482	Proliferación de la línea base del receptor	432	533	274		413	130.54	31.6
15		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	1459	633	598		896.7	487.31	54.3
20		Donante alogénico MLR IM04-2477 (tratado con mitomicina C)	24286	30823	31346		28818.3	3933.82	13.7
25		MLR con línea celular (célula tipo A tratada con mitomicina C)	2762	1502	6723		3662.3	2724.46	74.4
	SI (donante)						70		
	SI (línea celular)						9		
30	Número Analítico	Sistema de Cultivo	Réplicas						
			1	2	3		Media	SD	CV
35	IM04-2477 (Donador alogénico)	Proliferación de la línea base del receptor	312	419	349		360	54.34	15.1
40		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	567	604	374		515	123.5	24
45	Línea celular tipo A	Proliferación de la línea base del receptor	5101	3735	2973		3936.3	1078.19	27.4
50		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	1924	4570	2153		2882.3	1466.04	50.9
55									

55

60

65

**Tabla 11-5.** Índice de estimulación promedio de las células derivadas umbilicales y un donante alogénico en una reacción mixta de linfocitos con cinco receptores individuales alogénicos

Índice Promedio de Estimulación		
	Receptor	Umbilical
Plato 1 (receptores 1 - 4)	42.75	6.5
Plato 2 (receptor 5)	70	9

**Antígenos que presentan marcadores celulares - células derivadas de la placenta.** Histogramas de las células derivadas de la placenta analizados por citometría de flujo muestran una expresión negativa de HLA-DR, DP, DQ, CD80, CD86, y B7-H2, como se nota por el valor de fluorescencia consistente con el IgG de control, indicando que las líneas celulares placentarias no tenían las moléculas de superficie celular requeridas para estimular directamente las células CD4+ T.

**Marcadores inmunomoduladores - células derivadas de la placenta.** Los histogramas de las células derivadas de la placenta analizados por citometría de flujo muestran una expresión positiva de PD-L2, como se notó por el valor incrementado de fluorescencia relativo al IgG de control, y expresión negativa de CD 178 y HLA-G, como se nota con los valores de fluorescencia consistentes con el control IgG.

**Antígenos que presentan marcadores celulares - células derivadas umbilicales.** Los histogramas de células derivadas umbilicales que fueron analizados por citometría de flujo muestran expresiones negativas de HLA-DR, DP, DQ, CD80, CD86, y B7-H2, como se notó por el valor de fluorescencia consistente con el del control IgG, indicando que las líneas celulares umbilicales no tienen las moléculas de superficie celular requeridas para estimular directamente las células CD4+ T.

**Marcadores celulares inmunomoduladores - células derivadas umbilicales.** Los histogramas de las células derivadas umbilicales analizados por citometría de flujo muestran una expresión positiva de PD-L2, tal como se nota por el valor incrementado de la fluorescencia relativa a la del control IgG, y una expresión negativa de CD 178 y HLA-G, como se nota por el valor de fluorescencia consistente con el control IgG.

**Resumen.** Para las reacciones mixtas de linfocitos conducidas con las líneas celulares derivadas de placentas, el índice promedio de estimulación varió desde 1.3 a 3, y aquel de los controles alogénico positivos variaron desde 46.25 hasta 279. En las reacciones mixtas de linfocitos conducidas con las líneas celulares derivadas umbilicales el índice promedio de estimulación varió desde 6.5 hasta 9, y aquel del control alogénico positivo varió desde 42.75 hasta 70. Las líneas derivadas de la placenta y umbilicales fueron negativas para la expresión de las proteínas estimuladoras HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86, y B7-H2, como se midió por la citometría de flujo. Las líneas celulares derivadas de la placenta y umbilicales fueron negativas para la expresión de proteínas inmunomoduladoras HLA-G y CD 178 y positivas para la expresión de PD-L2, como se midió por la citometría de flujo. PBMCs donantes alogénicas contienen células con antígenos que expresan HLA-DR, DQ, CD8, CD86, y B7-H2, permitiendo por lo tanto la estimulación de células naïve CD4+ T. Las líneas celulares derivadas de la placenta y umbilicales fueron negativas para la expresión de proteínas inmunomoduladoras HLA-G y CD 178 y positivas para la expresión de PD-L2, como se midió por la citometría de flujo. Las PBMCs del donante alogénico, contenían células antígenas que presentaban expresiones de HLA-DR, DQ, CD8, CD86, y B7-H2, por lo tanto permitiendo la estimulación de células CD4+ T. La ausencia de moléculas de superficie celular que tengan antígenos en las células derivadas de la placenta y umbilicales requeridas para una estimulación directa de las células naïve CD4+ T y la presencia de PD-L2, una proteína inmunomoduladora, podría explicar el bajo índice de estimulación exhibido por estas células en un MLR en comparación de los controles alogénicos.

**EJEMPLO 12**

**Secreción de factores tróficos por las células derivadas de postparto**

Se midió la secreción de factores tróficos seleccionados de células derivadas de la placenta y umbilicales. Los factores seleccionados a detectarse incluyeron: (1) aquellos que se sabe que tienen actividad angiogénica, tal como el factor de crecimiento hepatocito (HGF) (Rosen et al. (1997) Ciba Found. Symp. 212:215-26), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1 - monocyte chemotactic protein) (Salcedo et al. (2000) Blood 96:34-40), interleucina-8 (IL-8) (Li et al. (2003) J. Immunol. 170:3369-76), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF - keratinocyte growth factor), factor de crecimiento de fibroblastos básicos (bFGF - basic fibroblast growth factor), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF - vascular endothelial growth factor) (Hughes et al. (2004) Ann. Thorac. Surg. 77:812-8), metaloproteinasas matriciales 1 (TIMP1), angiopoyetina 2 (ANG2), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB - platelet derived growth factor), trombo - poietin (TPO), el factor de crecimiento epidérmico de vinculación a heparina (HB-EGF - heparin-binding epidermal growth factor), factor derivado estromal-1

5 alfa (SDF-1 alfa - stromal-derived factor 1 alpha); (2) aquellos conocidos por tener actividad neurotrófica / neuroprotectora, tal como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF - brain-derived neurotrophic factor) (Cheng et al (2003) Dev Biol 258;... 319-33), la interleucina-6 (IL-6), proteína quimiotáctica de granulocitos -2 (GCP-2 - granulocyte chemotactic protein-2), factor de crecimiento transformante beta 2 (TGFbeta2 - transforming growth factor beta2); y (3) aquellos conocidos por tener actividad de quimioquinas, tales como la proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP1a - macrophage inflammatory protein 1 alpha), proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (MIP1b - macrophage inflammatory protein 1beta), monocitos quimioatrayentes-1 (MCP-1 - monocyte chemoattractant-1), Rantes (reguladas en la activación, células T normales expresadas y secretadas), 1309, el timo y la quimioquina regulada en su activación (TARC - thymus and activation-regulated chemokine), eotaxina, 10 quimioquina derivada de macrófagos (MDC - macrophage-derived chemokine), IL-8).

### **Métodos y Materiales**

15 **Cultivo celular.** Las PPDCs de la placenta y umbilicales así como fibroblastos humanos derivados de prepucio neonatal humano fueron cultivados en un medio de Crecimiento con penicilina / estreptomycin en matraces T75 cubiertos de gelatina. Las células fueron crió - conservadas en el pase 11 y almacenadas en nitrógeno líquido. Después de descongelar las células, se agregó un medio de crecimiento a las células seguido de su transferencia a un tubo centrífugo de 15 ml donde se procesaron las células a 150 x g durante cinco minutos. Los elementos 20 flotantes fueron descartados, el pellet de células fue re - suspendido en 4 ml de medio de crecimiento, y las células fueron contadas. Las células se sembraron a 375.000 células por cada Matraza de 75 cm<sup>2</sup> que contenían 15 ml de medio de crecimiento y fueron cultivados durante 24 horas. El medio fue cambiado a un medio libre de sueros (DMEM - de baja glucocosa (Gibco), 0.1% (masa / volumen) de albúmina de suero bovino (Sigma), penicilina / estreptomycin (Gibco)) durante ocho horas. El medio acondicionado sin sueros fue recolectado al final de la incubación por medio de centrifugación a 14.000 x g durante cinco minutos y almacenado a -20 grados centígrados. 25 Para estimar el número de células en cada matraza, las células fueron lavadas con PBS y separadas usando 2 ml de tripsina / EDTA. La actividad de la tripsina fue inhibida al aumentar 8 ml de medio de crecimiento. Las células fueron centrifugadas a 150 x g durante cinco minutos. El material flotante fue removido, y las células fueron re - suspendidas en 1 ml de medio de crecimiento. El número de células se estimó utilizando un hemocitómetro.

30 **Ensayo ELISA.** Las células fueron producidas a 37° C en 5% de dióxido de carbono y oxígeno atmosférico. Las células derivadas de la placenta (lote 101503) también crecieron con 5% de oxígeno o beta-mercaptoetanol (BME). La cantidad de MCP-1, IL-6, VEGF, SDF-1alfa, GCP-2 , IL-8, y TGF-beta 2 producido por cada muestra de células fue medido por un ensayo ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN). Todos los ensayos se realizaron de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes.

35 **Ensayo ELISA múltiple de SearchLight.** Se midieron quimioquinas (MIP1a, MIP1b, MCP-1, Rantes, 1309, TARC, Eotaxin, MDC, IL8), BDNF, y factores angiogénicos (HGF, KGF, bFGF, VEGF, TIMP1, ANG2, PDGF-bb, TPO, HB-EGF fueron medidos utilizando los ensayos Proteomas de SearchLight (Pierce Biotechnology Inc.). Los ensayos de Proteomas son empareados múltiples de ELISA para la medida cuantitativa de 2 a 16 proteínas por 40 pozo. Los ensayos se producen al colocar un patrón de 2 x 2, 3 x 3, o 4 x 4 de cuatro a 16 diferentes anticuerpos capturados en cada uno de los pozos de un plato de 96 pozos. Después del procedimiento de empareado de ELISA, se captura una imagen de todo el plato para captar una señal químico luminista ente generada en cada lugar dentro de cada pozo del plato. La cantidad que se genera de señal en cada lugar es proporcional a la cantidad de la proteína objetivo en el estándar o muestra original.

### **Resultados**

45 **Ensayos ELISA.** Las células derivadas de la placenta y umbilicales y los fibroblastos dérmicos secretaron MCP-1 e IL-6 (Tabla 12-1). SDF-1alfa fue secretado por células derivadas de la placenta cultivadas en un 5 % de O<sub>2</sub> y fibroblastos. GCP-2 e IL- 8 fueron secretados por células derivadas umbilicales y por células derivadas de la placenta cultivadas en la presencia de BME o 5% O<sub>2</sub>. También se secretó GCP-2 por fibroblastos humanos. TGF-beta2 no fue detectable por el ensayo de ELISA.

55

60

65

**Tabla 12-1.** Resultados del ensayo de ELISA

(valores presentados en picogramos / mililitros / millones de células (n=2, sem))							
	MCP-1	IL-6	VEGF	SDF-1α	GCP-2	IL-8	TGF-β2
Fibroblastos	17±1	61±3	29±2	19±1	21±1	ND	ND
Placenta (042303)	60±3	41±2	ND	ND	ND	ND	ND
Umbilical (022803)	1150±74	4234±289	ND	ND	160±11	2058±145	ND
Placenta (071003)	125±16	10±1	ND	ND	ND	ND	ND
Umbilical (071003)	2794±84	1356±43	ND	ND	2184±98	2369±23	ND
Placenta (101503) BME	21±10	67±3	ND	ND	44±9	17±9	ND
Placenta (101503) 5% O <sub>2</sub> , con O BME	77±16	339±21	ND	1149±137	54±2	265±10	ND
Clave: ND: No Detectado.							

**Ensayo ELISA múltiple de SearchLight.** TIMP1, TPO, KGF, HGF, FGF, HBEGF, BDNF, MIP1b, MCP1, RANTES, 1309, TARC, MDC, e IL-8 fueron secretadas de células derivadas umbilicales (Tablas 12 - 2 y 12 - 3). TIMP1, TPO, KGF, HGF, HBEGF, BDNF, MIP1a, MCP-1, RANTES, TARC, Eotaxin, e IL-8 fueron secretados de las células derivadas de la placenta (Tablas 12 - 2 y 12 - 3). No se detectaron Ang2, VEGF, o PDGF-bb.

**Tabla 12 - 2.** Resultados del ensayo ELISA múltiple de SearchLight

	TIMP1	ANG2	PDGFbb	TPO	KGF	HGF	FGF	VEGF	HBEGF	BDNF
hFB	19306.3	ND	ND	230.5	5.0	ND	ND	27.9	1.3	ND
P1	24299.5	ND	ND	546.6	8.8	16.4	ND	ND	3.81.3	ND
U1	57718.4	ND	ND	1240.0	5.8	559.3	148.7	ND	9.3	165.7
P3	14176.8	ND	ND	568.7	5.2	10.2	ND	ND	1.9	33.6
U3	21850.0	ND	ND	1134.5	9.0	195.6	30.8	ND	5.4	388.6
Clave: hFB (fibroblastos humanos), P1 (células derivadas de la placenta (042303)), U1 (células derivadas umbilicales (022803)), P3 (células derivadas de la placenta (071003)), U3 (células derivadas umbilicales (071003)). ND: No Detectado.										

**Tabla 12-3.** Resultados del ensayo ELISA múltiple de SearchLight

	MIP1a	MIP1b	MCP1	RANTES	1309	TARC	Eotaxin	MDC	IL8
hFB	ND	ND	39.6	ND	ND	0.1	ND	ND	204.9
P1	79.5	ND	228.4	4.1	ND	3.8	12.2	ND	413.5
U1	ND	8.0	1694.2	ND	22.4	37.6	ND	18.9	51930.1
P3	ND	ND	102.7	ND	ND	0.4	ND	ND	63.8
U3	ND	5.2	2018.7	41.5	11.6	21.4	ND	4.8	10515.9
Clave: hFB (fibroblastos humanos), P1 (PPDC derivada de la placenta (042303)), U1 (PPDC derivada umbilical (022803)), P3 (PPDC derivada de la placenta (071003)), U3 (PPDC derivada umbilical (071003)). ND: No Detectado.									

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

**EJEMPLO 13**

**Diferenciación neural a corto plazo de las Células Derivadas de Postparto**

5 Se examinó la habilidad de las células derivadas de la placenta y umbilicales (colectivamente de células derivadas de postparto o PPDCs - postpartum-derived cells) para diferenciarse en células de linaje neural.

**Materiales y métodos**

10 **Aislamiento y expansión de las células de postparto.** Las PPDCs de tejidos placentarios y umbilicales se aislaron y se expandieron de acuerdo a como se describió en el Ejemplo 1.

15 **Protocolo modificado de Woodbury-Black.** (A) Este ensayo fue adaptado de otro que fue originalmente realizado para probar la sesión neural potencial de las células estromales de médula ósea (1). Las células derivadas umbilicales (022803) P4 y las células derivadas de la placenta (042203) P3 fueron descongeladas y expandidas en cultivos en medios de crecimiento a 5000 células por centímetro cuadrado hasta alcanzar su sub - confluencia (75%). Después las células fueron tripnizadas y sembradas a 6000 células por pozo en un porta objetos de vidrio Titretek II (VWR International, Bristol, CT). Como controles, se sembraron bajo las mismas condiciones células madres mesénquimas (P3; 1F2155; Cambrex, Walkersville, MD), osteoblastos (P5; CC2538; Cambrex), células derivadas de adiposas (Artecel, US6555374 B1) (P6; donador 2) y fibroblastos dérmicos humanos neonatales (P6; CC2509; Cambrex).

25 Todas las células fueron expandidas inicialmente durante cuatro días en un medio DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA) con 15% (volumen / volumen) de suero bovino fetal (FBS; Hyclone, Logan, UT), factor de crecimiento de fibroblastos básicos (bFGF; 20 nano gramos / mililitros; Pepro-tech, Rocky Hill, NJ), factor de crecimiento epidérmico (EGF; 20 nano gramos / mililitros; Peprotech) y penicilina / estreptomycin (Invitrogen). Después de cuatro días, las células fueron enjuagadas en tampón fosfato salino (PBS; Invitrogen) y fueron cultivadas subsiguientemente en un medio DMEM/F12 + 20% (volumen / volumen) FBS + penicilina / estreptomycin durante 24 horas. Después de 24 horas, las células fueron enjuagadas con PBS. Las células fueron cultivadas entonces durante una a seis horas en un medio de inducción que contenía DMEM/F12 (sin suero) con 200 mM de hidroxianisól butilado, 10 µM de cloruro de potasio, 5 miligramos / mililitro de insulina, 10 µM de forskolina, 4 µM de ácido valproico, y 2 µM de hidrocortisona (todos los productos químicos de Sigma, St. Louis, MO). Las células fueron fijadas en 100% de metanol enfriado con hielo y se realizó inmunocitoquímica (referirse a los métodos a continuación) para evaluar la expresión de la proteína nestina humana.

35 (B) las PPDCs (umbilicales (022803) P11; placentarias (042203) P11) y fibroblastos dérmicos humanos adultos (1F1853, P11) fueron descongelados y los cultivos fueron expandidos en medios de crecimiento a 5000 células por centímetro cuadrado hasta que se alcanzó la sub - confluencia (75%). Las células fueron entonces tripnizadas y sembradas a una densidad similar como en (a), pero en (1) en platos de 24 pozos de tejido de cultivo tratado (TCP, Falcon brand, VWR International), (2) posos TCP + 2% (masa / volumen) de gelatina absorbida durante una hora a la temperatura del cuarto, o (3) posos TCP + 20 µg / mililitro absorbidos de laminina de ratón (absorbidos durante un mínimo de dos horas a 37 °C; Invitrogen).

45 Exactamente como en (A), las células se expandieron inicialmente y se cambió el medio de acuerdo a los tiempos antes mencionados. Un conjunto de cultivos se mantuvo fijo, como antes, durante cinco días y seis horas, este tiempo con 4% (masa / volumen) de paraformaldehído helado (Sigma) durante 10 minutos a la temperatura del cuarto. En el segundo conjunto de cultivos, el medio se removió y se cambió un medio de Expansión Progenitora Neural (NPE - Neural Progenitor Expansion) que consistió de un medio neurobasal-A (Invitrogen) que contenía B27 (suplemento B27; Invitrogen), L-glutamina (4 mM), y penicilina / estreptomycin (Invitrogen). El medio NPE fue suplementado adicionalmente con ácido retinoico (RA - retinoic acid; 1 µM; Sigma). Este medio fue removido cuatro días después y se fijaron los cultivos con un 4% (masa / volumen) de paraformaldehído helado (Sigma) durante 10 minutos a la temperatura del cuarto, y se coloreó para detectar la expresión de las proteínas de nestina, GFAP, y TuJ1 (ver la Tabla N1-1).

55 **Tabla 13 - 1.** Resumen de los anticuerpos primarios usados

Anticuerpo	Concentración	Proveedor
Rata 401 (destina)	1:200	Chemicon, Temecula, CA
Destina humana	1:100	Chemicon
TuJ1 (BIII Tubulina)	1:500	Sigma, St. Louis, MO
60 GFAP	1:2000	DakoCytomation, Carpinteria, CA
Tirosina hidroxilasa (TH - Tyrosine hydroxylase)	1:1000	Chemicon
GABA	1:400	Chemicon
Desmina (ratón)	1:300	Chemicon
Actina de músculo liso-alfa-alfa	1:400	Sigma
65 Proteína nuclear humana (hNuc)	1:150	Chemicon

**Protocolo de diferenciación de dos etapas.** Las PPDCs (umbilicales (042203) P11, placentarias (022803) P11), fibroblastos dérmicos humanos adultos (P11; 1F1853; Cambrex) fueron descongelados y los cultivos fueron expandidos en un medio de crecimiento a 5000 células por centímetro cuadrado hasta alcanzar su sub - confluencia (75%). Las células fueron tripnizadas y sembradas a 2000 células por centímetro cuadrado, pero en platos de 24 posos cubiertos con laminina (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) en la presencia de un medio NPE suplementado con bFGF (20 nano gramos / mililitros; Peprotech, Rocky Hill, NJ) y EGF (20 nano gramos / mililitro; Peprotech) [toda la composición del medio referida a continuación como NPE + F + E]. Al mismo tiempo, se aislaron del hipocampo progenitores neurales de rata adulta (P4; 0626030 también se pusieron en platos de 24 posos cubiertos con laminina en un medio NPE + F + E. Todos los cultivos se mantuvieron en esas condiciones por un período de seis días (las células fueron alimentadas una vez durante ese tiempo) en donde se cambió el medio a las condiciones de diferenciación listadas en la Tabla N1-2 por un período adicional de siete días. Los cultivos se fijaron con un 4% (masa / volumen) de paraformaldehído helado (Sigma) durante 10 minutos a la temperatura del cuarto, y se coloreó para detectar expresiones proteínicas de Nestina, GFAP, y TuJ1 de rata.

**Tabla 13-2.** Resumen de las condiciones para el protocolo de diferenciación de dos etapas

	A	B
# DE COND.	PRE-DIFERENCIACIÓN	DIFERENCIA DE LA 2da ETAPA
1	NPE + F (20 ng / ml) + E (20 ng / ml)	NPE + SHH (200 ng / ml) + F8 (100 ng / ml)
2	NPE + F (20 ng / ml) + E (20 ng / ml)	NPE + SHH (200 ng / ml) + F8 (100 ng / ml) + RA (1 microM)
3	NPE + F (20 ng / ml) + E (20 ng / ml)	NPE + RA (1 microM)
4	NPE + F (20 ng / ml) + E (20 ng / ml)	NPE + F (20 ng / ml) + E (20 ng / ml)
5	NPE + F (20 ng / ml) + E (20 ng / ml)	Medio de Crecimiento
6	NPE + F (20 ng / ml) + E (20 ng / ml)	Condición 1B + MP52 (20 ng / ml)
7	NPE + F (20 ng / ml) + E (20 ng / ml)	Condición 1B + BMP7 (20 ng / ml)
8	NPE + F (20 ng / ml) + E (20 ng / ml)	Condición 1B + GDNF (20 ng / ml)
9	NPE + F (20 ng / ml) + E (20 ng / ml)	Condición 2B + MP52 (20 ng / ml)
10	NPE + F (20 ng / ml) + E (20 ng / ml)	Condición 2B + BMP7 (20 ng / ml)
11	NPE + F (20 ng / ml) + E (20 ng / ml)	Condición 2B + GDNF (20 ng / ml)
12	NPE + F (20 ng / ml) + E (20 ng / ml)	Condición 3B + MP52 (20 ng / ml)
13	NPE + F (20 ng / ml) + E (20 ng / ml)	Condición 3B + BMP7 (20 ng / ml)
14	NPE + F (20 ng / ml) + E (20 ng / ml)	Condición 3B + GDNF (20 ng/ml)
15	NPE + F (20 ng / ml) + E (20 ng / ml)	NPE + MP52 (20 ng / ml)
16	NPE + F (20 ng / ml) + E (20 ng / ml)	NPE + BMP7 (20 ng / ml)
17	NPE + F (20 ng / ml) + E (20 ng / ml)	NPE + GDNF (20 ng / ml)

**Protocolo de múltiples factores de crecimiento.** Las células derivadas umbilicales (P11; (042203)) fueron descongeladas y expandidas en cultivos en un medio de crecimiento a 5000 células por centímetro cuadrado hasta alcanzar la sub - confluencia (75%). Las células fueron entonces tripnizadas y sembradas a 2000 células por centímetro cuadrado en platos cubiertos con laminina de 24 posos (BD Biosciences) en la presencia de NPE + F (20 nano gramos / mililitro) + E (20 nano gramos / mililitro). Adicionalmente, algunos pozos tuvieron NPE + F + E + 2% FBS o 10% FBS. Después de cuatro días de condiciones de "pre-diferenciación", se removió todo el medio y las muestras fueron colocadas en un medio NPE suplementado con Sonic hedgehog (SHH; 200 nano gramos / mililitro; Sigma, St. Louis, MO), FGF8 (100 nano gramos / mililitro; Peprotech), BDNF (40 nano gramos / mililitro; Sigma), GDNF (20 nano gramos / mililitro; Sigma), y ácido retinoico (1µM; Sigma). Siete días después del cambio del medio, se fijaron los cultivos con un 4% (masa / volumen) de paraformaldehído (Sigma) durante 10 minutos a la temperatura del cuarto, y se coloreó para detectar expresiones de nestina, GFAP, TuJ1, desmina y actina de músculo esquelético alfa humanas.

**Protocolo de co-cultivo progenitor neural.** Se plantaron como neuroesferas o como células individuales (10.000 células por pozo) a progenitores de hipocampo de rata adulta (062603) a discos de 24 posos cubiertos con laminina (BD Biosciences) en NPE + F (20 nano gramos / mililitro) + E (20 nano gramos / mililitro).

Se descongelaron por separado células derivadas umbilicales (042203) P11 y células derivadas de la placenta (022803) P11 y se expandieron en cultivos NPE + F (20 nano gramos / mililitro) + E (20 nano gramos / mililitro) a 5000 células por centímetro cuadrado durante un período de 48 horas. Las células fueron entonces

tripnizadas y sembradas a 2500 células por pozo en cultivos existentes de progenitores neurales. En ese momento, el medio existente fue cambiado por un medio fresco. Después de cuatro días, los cultivos se fijaron con un 4% (masa / volumen) de paraformaldehído helado (Sigma) durante 10 minutos a la temperatura del cuarto, y se coloreó para detectar proteínas nucleares humanas (hNuc - human nuclear; Chemicon) (Tabla NU1-1 mostrada anteriormente) para identificar a las PPDCs.

**Inmunocitoquímica.** Se realizó inmunocitoquímica usando los anticuerpos listados en la Tabla NU1-1. Los cultivos fueron lavados con tampón fosfato salino (PBS) y expuestos a una solución de bloqueo de proteínas que contenía PBS, 4% (volumen / volumen) de suero de cabra (Chemicon, Temecula, CA), y 0.3 por ciento (volumen / volumen) de Tritón (Triton X-100; Sigma) durante 30 minutos para ganar acceso a antígenos intracelulares. Anticuerpos primarios, que fueron diluidos en la solución de bloqueo, se aplicaron entonces a los cultivos durante un período de una hora a la temperatura del cuarto. Después, las soluciones de anticuerpos primarios fueron removidas y los cultivos fueron lavados con PBS antes de la aplicación de soluciones de anticuerpos secundarios (una hora a la temperatura del cuarto) que contenían soluciones de bloqueo junto con IgG de cabra anti ratón - Texas Red (1:250; Molecular Probes (Sondas Moleculares), Eugene, OR) e IgG de cabra anti conejo - Alexa 488 (1:250; Molecular Probes (Sondas Moleculares)). Los cultivos se lavaron entonces y se aplicaron 10  $\mu$ mol DAPI (Molecular Probes - Sondas Moleculares) durante 10 minutos para visualizar el núcleo de la célula.

Después de inmunotinturar, se visualizó la fluorescencia usando el filtro de fluorescencia apropiado en un microscopio fluorescente - epi invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). En todos los casos, una mancha positiva represento una señal de fluorescencia superior a la mancha de control donde todo el procedimiento señalado anteriormente fue seguido con la excepción de la aplicación de una solución de anticuerpos primarios. Imágenes representativas fueron capturadas usando una vídeo cámara digital a color y el software ImagePro (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para muestras que fueron tinturadas en forma triple, cada imagen fue tomada usando sólo un filtro de emisión a la vez. Los montajes en capas fueron preparados utilizando el software Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA).

### Resultados

**Protocolo Woodbury-Black.** (A) En el momento de la incubación en esta composición de inducción neural, todos los tipos de células se transformaron en células con morfologías bipolares y procesos extendidos. También se observaron otras morfologías importantes no bipolares. Es más, las poblaciones celulares lucidas tuvieron coloración positiva en lo que se refiere a nestina, un marcador de células madre neurales multipotentes y de células progenitoras.

(B) Cuando esto se repitió en platos plásticos de cultivos de tejido (TCP), la expresión de nestina no se observó a menos que laminina haya sido pre - absorbida en la superficie del cultivo. Para evaluar en una mayor forma si las células que expresan nestina podrían ir entonces a generar neuronas maduras, las PPDCs y fibroblastos fueron expuestos a NPE + RA (1 $\mu$ M), una composición de medio conocido por inducir la diferenciación de células madre neurales y células progenitoras en aquellas células (2, 3, 4). Las células fueron tinturadas para detectar TuJ1, un marcador de neuronas inmaduras y maduras, GFAP, un marcador de astrocitos, y nestina. Bajo ninguna condición se detectó a TuJ1 ni se observaron células con morfología neural, sugiriendo que ninguna neurona fue generada en el corto plazo. Más aún, la nestina y GFAP ya no estaban expresadas en las PPDCs tal como se determinó por la inmunocitoquímica.

**Diferenciación de dos etapas.** Los aislamientos PPDC umbilicales y placentarios (así como fibroblastos humanos y progenitores neurales de roedores como tipos de célula de control negativo y positivo, respectivamente) fueron colocados en platos con laminina (promoción neural) y expuestos a 13 condiciones de crecimiento diferentes (y dos condiciones de control) conocidas por promover la diferenciación de progenitores neurales a neuronas y astrocitos. Adicionalmente, dos condiciones fueron añadidas para examinar la influencia de GDF5, y BMP7 en la diferenciación PPDC. Generalmente, se tomó un método de diferenciación de dos pasos, en el cual las células primero se colocaban en condiciones de expansión progenitora neural durante un período de seis días, seguido por condiciones completas de diferenciación durante siete días. Desde el punto de vista morfológico, ambas células derivadas umbilicales y de la placenta exhibieron cambios fundamentales en su morfología celular al pasar del tiempo de este procedimiento. Sin embargo, no se observaron células con forma neural o de astrocitos a excepción de las que estaban en el grupo de control, bajo condiciones en platos para progenitores neurales. Una inmunocitoquímica negativa de nestina humana, TuJ1, y GFAP confirmó las observaciones morfológicas.

**Factores de crecimiento múltiple.** Después de una semana de la exposición a varios agentes de diferenciación neural, las células fueron tinturadas para identificar marcadores indicativos de progenitores neurales (nestina humana), neuronas (TuJ1), y astrocitos (GFAP). Las células que crecieron en la primera etapa en un medio que no contenía ningún suero tenían morfologías diferente es que aquellas células en un medio que contenía suero (2% o 10%), indicando una diferenciación neural potencial. Específicamente, siguiendo un procedimiento de dos pasos para exponer las células derivadas umbilicales a EGF y bFGF seguido de SHH, FGF8, GDNF, BDNF, y ácido retinoico, las células mostraron procesos largos similares a la morfología de astrocitos cultivados. Cuando se incluyó FBS en un 2% y en un 10% en la primera etapa de diferenciación, el número de células se incrementó y la

morfología celular no cambio en comparación con los cultivos de control a alta densidad. No se evidenció ninguna diferenciación neural esencial con el análisis inmuno citoquímico para nestina humana, TuJ1, o GFAP.

5 **Progenitor neural y co – cultivos PPDC.** Las PPDCs fueron chapadas en otros cultivos de progenitores  
 10 neurales de rata sembradas dos días antes en condiciones de expansión neural (NPE + F + E). Mientras una  
 confirmación visual de las PPDCs chapadas probaron que estas células fueron chapadas como células individuales,  
 una tinción nuclear específica humana (hNuc) cuatro días después del chapeo (seis días en total) mostró que estas  
 15 tendían a acumularse y evitar contacto con los progenitores neurales. Es más, en los lugares en los que las PPDCs  
 se adherían, estas células se dispersaban y parecían invadidas por las neuronas diferenciadas de origen de rata,  
 sugiriendo que las PPDCs pueden haberse diferenciado en células de músculo. Esta observación se basó en la  
 morfología bajo la fase de contraste con un microscopio. Otra observación fue que cuerpos celulares típicamente  
 grandes (más grandes que los progenitores neurales) tenían morfologías similares a progenitores neurales, con  
 procesos delgados que se extendían en múltiples direcciones. La tinción HNuc (encontrada en la mitad de los  
 20 núcleos de las células) sugirió que en algunos casos estas células humanas pueden haberse fusionado con las  
 progenitoras de rata y pueden haber asumido su fenotipo. Pozos de control que contenían solamente progenitores  
 neurales tenían menos progenitores en total y menos células diferenciadas que las que tenían los pozos co -  
 cultivados correspondientes a las PPDCs umbilicales o de placenta, indicando que ambas células derivadas  
 umbilicales y de la placenta influenciaron la diferenciación y el comportamiento de los progenitores neurales, ya sea  
 por la liberación de quimioquinas y citoquinas, o por efectos del contacto mantenido en el medio.

25 **Resumen.** Se realizaron varios protocolos para determinar el potencial a corto plazo de las PPDCs para  
 diferenciarse en células de linaje neural. Estos incluyeron contraste de imágenes por fases de la morfología en  
 combinación con inmunocitoquímica para nestina, TuJ1, y GFAP, proteínas asociadas con células madre neurales  
 multipotentes y progenitoras, neuronas inmaduras y maduras, y astrocitos, respectivamente. Se observó evidencia  
 que sugiere que la diferenciación neural ocurrió en ciertas instancias en estos protocolos a corto plazo.

30 Algunas observaciones notables se hicieron en co – cultivos de PPDCs con progenitores neurales. Este  
 método, usando PPDCs humanas con tipos de célula xenogéneas permitió una determinación absoluta del origen  
 de cada célula en estos cultivos. Primero, algunas de las células en estos cultivos mostraron un citoplasma celular  
 agrandado, con procesos similares a neuritas alejándose del cuerpo celular, sin embargo sólo la mitad del cuerpo  
 estaba marcado con proteína hNuc. Aquellas células pudieron haber sido PPDCs humanas que se diferenciaron en  
 células de linaje neural o pueden haber sido PPDCs que se fusionaron con progenitores neurales. Segundo,  
 aparentemente los progenitores neurales extendieron neuritas a las PPDCs en una forma que indica que los  
 35 progenitores se diferenciaron en neuronas e invadieron las PPDCs. Tercero, cultivos de progenitores neurales y  
 PPDCs tenían más células de origen de rata y cantidades más grandes de diferenciación que los cultivos de control  
 que contenían sólo progenitores neurales, indicando en mayor forma que las PPDCs chapeadas suministraron  
 factores solubles y / o mecanismos que dependen del contacto que estimularon la supervivencia, proliferación, y / o  
 diferenciación de los progenitores neurales.

#### 40 **Referencias para el Ejemplo 13**

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

#### **EJEMPLO 14**

##### 50 **Diferenciación neural a largo plazo de células derivadas de postparto**

Se evaluó la habilidad de las células derivadas umbilicales y de la placenta (colectivamente células  
 derivadas de postparto o PPDCs) para experimentar diferenciación a largo plazo a células de linaje neural.

##### 55 **Materiales y métodos**

**Aislamiento y expansión de las PPDCs.** Las PPDCs fueron aisladas y expandidas tal como se describió  
 en los ejemplos anteriores.

60 **Descongelamiento y chapado de las células PPDC.** Porciones congeladas de las PPDCs (umbilical  
 (022803) P11; (042203) P11; (071003) P12; placentario (101503) P7) que habían crecido previamente en medios de  
 crecimiento fueron descongeladas y chapadas a 5000 células por centímetro cuadrado en matraces T-75 cubiertos  
 con laminina (BD, Franklin Lakes, NJ) en un medio neurobasal-A (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contiene B27  
 (suplemento B27, Invitrogen), L-glutamina (4 mM), y penicilina / estreptomycin (10 mililitros), la combinación a la  
 65 cual se denomina aquí como Medio de Expansión de Progenitores Neurales (NPE - Neural Progenitor Expansion). El  
 medio NPE fue suplementado adicionalmente con bFGF (20 nano gramos / mililitro, Peprotech, Rocky Hill, NJ) y  
 EGF (20 nano gramos / mililitro, Peprotech, Rocky Hill, NJ), aquí referido como NPE + bFGF + EGF.

**Chapeo de las células de control.** Adicionalmente, los fibroblastos dérmicos humanos adultos (P11, Cambrex, Walkersville, MD) y las células madres mesénquimas (P5, Cambrex) fueron descongeladas y chapadas a la misma densidad de siembra celular en matraces T-75 cubiertos con laminina en NPE + bFGF + EGF. Para incrementar el control, las PPDCs fibroblastos, umbilicales y de placenta fueron cultivados en un medio de crecimiento durante el período especificado para todos los cultivos.

**Expansión celular.** Los medios de todos los cultivos se reemplazaron con medios frescos una vez a la semana y se observaba a las células para ver si presentaban expansión. En general, cada cultivo se pasaba una vez durante un período de un mes por el crecimiento limitado en NPE + bFGF + EGF.

**Inmunocitoquímica.** Después de un periodo de un mes, todos los matraces se fijaban con un 4% (masa / volumen) de paraformaldehído frío (Sigma) durante 10 minutos a la temperatura del cuarto. La inmunocitoquímica se realizaba usando anticuerpos dirigidos en contra de TuJ1 (BIII Tubulina; 1:500; Sigma, St. Louis, MO) y GFAP (proteína ácida glial fibrilar; 1:2000; DakoCytomation, Carpinteria, CA). Brevemente, los cultivos se lavaban con tampón fosfato salino (PBS) y se exponían a una solución de bloqueo de proteínas que contenía PBS, 4% (volumen / volumen) de suero de cabra (Chemicon, Temecula, CA), y 0.3 por ciento (volumen / volumen) de Tritón (Triton X-100; Sigma) durante 30 minutos para ganar acceso a antígenos intracelulares. Anticuerpos primarios, diluidos en la solución de bloqueo, fueron aplicados entonces a los cultivos durante un período de una hora a la temperatura del cuarto. Después, las soluciones de anticuerpos primarios fueron removidas y los cultivos se lavaron con PBS antes de aplicar las soluciones de anticuerpos secundarios (una hora a la temperatura del cuarto) que contenían bloqueos junto con el IgG de cabra anti ratón - Texas Red (1:250; Molecular Probes (Sondas Moleculares), Eugene, OR) e IgG de cabra anti conejo - Alexa 488 (1:250; Molecular Probes - Sondas Moleculares). Los cultivos fueron lavados entonces y se aplicaron 10 µmol DAPI (Sondas Moleculares) durante 10 minutos para visualizar el núcleo de la célula.

Después de la inmunotinción, se visualizó la fluorescencia utilizando el filtro de fluorescencia apropiado en un microscopio fluorescente - epi invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). En todos los casos, una tinción positiva representaba una señal de fosforescencia por sobre la tinción del control donde todo el procedimiento que se señaló anteriormente fue seguido a excepción de la aplicación de la solución de anticuerpos primarios. Capturadas utilizando una videocámara digital a color y el software ImagePro software (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para muestras que tenían tres coloraciones, cada imagen fue tomada usando un sólo filtro de emisión a la vez. Montajes de capas se prepararon entonces usando el software Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA).

**Tabla 14-1.** Resumen de los anticuerpos primarios utilizados

Anticuerpo	Concentración	Proveedor
TuJ1 (BIII Tubulina)	1:500	Sigma, St. Louis, MO
GFAP	1:2000	DakoCytomation, Carpinteria, CA

**Resultados**

**El medio NPE + bFGF + EGF retarda la proliferación de las PPDCs y altera su morfología.** Inmediatamente después del chapado, un subconjunto de PPDCs se adjuntó a los Matraces de cultivos cubiertos con laminina. Esto pudo deberse a la muerte celular como una función del proceso de congelamiento / descongelamiento o por las nuevas condiciones de crecimiento. Las células que se adhirieron adquirieron morfologías diferentes a aquellas observadas en el medio de crecimiento.

En el momento de confluencia, los cultivos fueron pasados y observados para determinar su crecimiento. Muy poca expansión ocurrió de aquellas células que sobrevivieron el pase. En este punto, células muy pequeñas sin ninguna propagación morfológica y con características de fase brillante empezaron a aparecer en los cultivos de las células derivadas umbilicales. Estas áreas de los matraces fueron observadas durante algún tiempo. De estas células pequeñas, procesos bifurcantes emergieron con varicosidades en todo su largo, características muy similares a lo descrito previamente de los progenitores neurales PSA-NCAM+ y neuronas progenitoras y TuJ1+ neuronas inmaduras derivadas del cerebro y de la médula espinal (1, 2). Con el tiempo, estas células se volvieron más numerosas, pero sólo se encontraron en clones.

**Clones de células derivadas umbilicales expresan proteínas neurales.** Los cultivos se fijaron un mes después de su descongelamiento / chapado y tinturado para detectar la proteína neural TuJ1 y GFAP, filamento intermedio encontrado en astrocitos. Mientras todos los cultivos de control cultivados en medios de crecimiento y fibroblastos humanos y MSCs cultivados en medios NPE + bFGF + EGF, TuJ1-/GFAP-, se detectó TuJ1 en las PPDCs umbilicales y de la placenta. Se observó esa expresión en células con y sin morfologías tipo neural. No se observó ninguna expresión GFAP en ningún cultivo. El porcentaje de células que expresaron TuJ1, morfologías similares a las neurales fue menos o igual al 1% to de la población total (n = 3 aislamientos de células derivadas umbilicales probadas) aunque no fue cuantificado, el porcentaje de células TuJ1+ sin morfologías neurales fue más alto en los cultivos celulares derivados umbilicales que en los cultivos celulares derivados de la placenta. Estos

resultados parecían específicos en relación a los controles que emparejan la edad en medios de crecimiento que no expresaban TuJ1.

**Resumen.** Se desarrollaron métodos para generar neuronas diferenciadas (basándose en la expresión TuJ1 y la morfología neuronal) de células derivadas umbilicales. Aunque las expresiones de TuJ1 no fueron examinadas antes de un mes in vitro, es claro que por lo menos una población pequeña de las células derivadas umbilicales pueden dar paso a neuronas ya sea por medio de una diferenciación estándar o por medio de una inducción a largo plazo después de un mes de exposición a medios mínimos suplementados con L- glutamina, FGF básica, y EGF.

**Referencias para el ejemplo 14**

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

**EJEMPLO 15**

**Factores tróficos PPDC para el soporte de progenitores neurales**

Se examinó la influencia de células derivadas umbilicales y de la placenta (en conjunto células derivadas de postparto o PPDCs) en la supervivencia y diferenciación de células madres y progenitoras neurales adultas por medio de mecanismos dependientes (tróficos) sin contacto.

**Materiales y métodos**

**Aislamiento de células madre y progenitoras neurales adultas.** Ratas adultas Fisher 344 fueron sacrificadas mediante asfixia usando CO2 seguido por una dislocación cervical. Todo el cerebro fue removido intacto usando pinzas óseas y tejido hipocampo diseccionado basándose en incisiones coronales posteriores a las regiones motrices y somatosensoriales del cerebro (Paxinos, G. & Watson, C. 1997. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates - El Cerebro de la Rata en Coordinadas Estereotáxicas). El tejido se lavó en un medio Neurobasal – A (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contenía B27 (suplemento B27; Invitrogen), L- glutamina (4mM; Invitrogen), y penicilina / estreptomycin (Invitrogen), la combinación a la cual se denomina aquí como medio de expansión progenitor neural (NPE). El medio NPE fue suplementado adicionalmente con bFGF (20 nano gramos / mililitros, Peprotech, Rocky Hill, NJ) y EGF (20 nano gramos / mililitros, Pepro-tech, Rocky Hill, NJ), denominados aquí como NPE + bFGF + EGF.

Después de lavado, se retiraron las meninges superpuestas, y se desmenuzó el tejido con un bisturí. El tejido desmenuzado fue recolectado y se agregó tripsina / EDTA (Invitrogen) como el 75% del volumen total. También se agregó seADN (100 µl por 8 ml del volumen total, Sigma, St. Louis, MO). Después, el tejido / medio fue pasado secuencialmente de a través de una aguja de medición 18, una aguja de medición 20 y finalmente una aguja de medición 25 una vez por cada una (todas las agujas de Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). La mezcla fue centrifugada durante tres minutos a 250 g. El material flotante fue removido, se agregó NPE + bFGF + EGF fresco y el pellet fue re - suspendido. La suspensión celular resultante fue pasada a través de un filtro celular de 40 µm (Becton Dickinson), chapados en matraces T-75 cubiertos con laminina (Becton Dickinson) o platos de 24 pozos de bajas agrupaciones (Becton Dickinson), y cultivados en medios NPE + bFGF + EGF hasta obtenerse suficientes números celulares para los estudios señalados.

**Chapado de PPDCs.** Las células derivadas de postparto (umbilicales (022803) P12, (042103) P12, (071003) P12; placenta (042203) P12) previamente cultivadas en medios de crecimiento fueron chapadas a 5000 células por inserción Transwell (tamaño diseñado para un plato de 20:04 pozos) y cultivado durante un período de una semana en medios de crecimiento en inserciones para lograr su confluencia.

**[0317] Chapado de progenitores neurales adultos.** Los progenitores neurales cultivados como neuroesferas o como células individuales, se sembraron en platos de 24 pozos cubiertos con laminina a una densidad aproximada de 2000 células por pozo en NPE + bFGF + EGF durante un período de un día para promover su adherencia celular. Un día después, inserciones transwell que contenían células postparto fueron añadidas de acuerdo al siguiente esquema:

- (1) Transwell (células derivadas umbilicales en medio de crecimiento, 200 µl) + progenitores neurales (NPE + bFGF + EGF, 1 mililitro)
- (2) Transwell (células derivadas de la placenta en medio de crecimiento, 200 µl) + progenitores neurales (NPE + bFGF + EGF, 1 mililitro)
- (3) Transwell (fibroblastos dérmicos humanos adultos [1F1853; Cambrex, Walkersville, MD] P12 en medio de crecimiento, 200 µl) + progenitores neurales (NPE + bFGF + EGF, 1 mililitro)
- (4) Control: progenitores neurales individuales (NPE + bFGF + EGF, 1 mililitro)
- (5) Control: progenitores neurales individuales (solamente NPE, 1 ml)

**Inmunocitoquímica.** Después de siete días en co - cultivo, todas las condiciones se fijaron con un 4% (masa / volumen) de paraformaldehído (Sigma) durante un período de 10 minutos en temperatura del cuarto. Se realizó la inmunocitoquímica usando anticuerpos dirigidos en contra de los epítopes listados en la Tabla 15 - 1. Brevemente, se lavaron los cultivos con tampón fosfato salino (PBS) y se los expuso a una solución de bloqueo de proteínas que contenía PBS, 4% (volumen / volumen) de suero de cabra (Chemicon, Temecula, CA), y 0.3 por ciento (volumen / volumen) de Tritón (Triton X-100; Sigma) durante 30 minutos para ganar acceso a antígenos intracelulares. Entonces se aplicaron anticuerpos primarios, diluidos en solución de bloqueo, a los cultivos durante un período de una hora a la temperatura del cuarto. Después, se removieron los anticuerpos primarios y se lavaron los cultivos con PBS antes de la aplicación de soluciones de anticuerpos secundarios (una hora a la temperatura del cuarto) que contenían una solución de bloqueo junto con IgG de cabra anti ratón - Texas Red (1:250; Molecular Probes, (Sondas Moleculares) Eugene, OR) e IgG de cabra anti conejo - Alexa 488 (1:250; Molecular Probes - Sondas Moleculares). Los cultivos fueron lavados entonces y se aplicaron 10  $\mu$ mol de DAPI (Sondas Moleculares) durante 10 minutos para visualizar el núcleo celular.

Después de la inmunotinción, se visualizó fluorescencia utilizando el filtro de fluorescencia apropiado en un microscopio fluorescente - epi invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). En todos los casos, una tinción positiva representaba una señal de fluorescencia por sobre la tinción de control donde todo el procedimiento señalado anteriormente fue seguido con la excepción de la aplicación de una solución de anticuerpos primaria. Las imágenes representativas fueron capturadas utilizando una videocámara a color digital y software ImagePro (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para muestras con tres tinciones, cada imagen era tomada usando solamente un filtro de emisión a la vez. Montajes en capas fueron preparados entonces utilizando el software Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA).

**Tabla 15 - 1.** Resumen de los anticuerpos primarios utilizados

Anticuerpo	Concentración	Proveedor
Rata 401 (nestina)	1:200	Chemicon, Temecula, CA
TuJ1 (BIII Tubulina)	1:500	Sigma, St. Louis, MO
Tirosina hidroxilas (TH)	1:1000	Chemicon
GABA	1:400	Chemicon
GFAP	1:2000	DakoCytomation, Carpinteria, CA
Proteína básica mielina (MBP)	1:400	Chemicon

**Análisis cuantitativo de diferenciación progenitora neural.** Se examinó la cuantificación de la diferenciación progenitora neural de hipocampos. Se contaron un mínimo de 1000 células por condición o menos. Se evaluó el porcentaje de células positivas de una tinción específica al dividir el número de células positivas para el número total de células como se determinó por la tinción DAPI (nuclear).

**Análisis de espectrometría de masa y electroforesis con gel 2D.** Para identificar factores únicos secretados como resultado de co - cultivo, se tomaron muestras de medios acondicionados antes de que la fijación de los cultivos fuese congelada a -80 °C durante la noche. Las muestras fueron aplicadas entonces a dispositivos de ultrafiltración por medio de centrifugación (MW cutoff 30 kD). Se aplicó lo retenido a cromatografía de inmunoafinidad (albúmina - anti - Hu: IgY) (la inmunoafinidad no removió la albúmina de las muestras). El filtrado fue analizado por MALDI. Lo que pasó fue aplicado a la cromatografía de inmunoafinidad Cibachron Blue. Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE y electroforesis con gel 2D.

**Resultados**

**El co-cultivo PPDC estimula la diferenciación progenitora neural.** Después del cultivo con células derivadas umbilicales o de la placenta, las células progenitoras neurales co - cultivadas de hipocampo de rata adulta exhibieron una diferenciación significativa en los tres linajes importantes en el sistema nervioso central. Éste efecto fue observado claramente después de cinco días en co - cultivo, con numerosas células que elaboraban procesos complejos y perdían sus propiedades características brillantes de la fase de dividirse en células progenitoras. Por otro lado, las progenitoras neurales que se cultivaron solas en la ausencia de bFGF y EGF no parecían saludables y su supervivencia fue limitada.

Después de completar el procedimiento, los cultivos fueron tintados para detectar marcadores indicativos de células madres y progenitoras no diferenciadas (nestina), neuronas inmaduras y maduras (TuJ1), astrocitos (GFAP), y oligodendrocitos maduros (MBP). Se confirmó la diferenciación en los tres linajes mientras que las condiciones de control no mostraron una diferenciación significativa tal como se evidenció por la retención de la tinción positiva de nestina en la mayoría de células. Aunque las células derivadas umbilicales y de la placenta indujeron diferenciación de células, el grado de diferenciación para los tres linajes fue menos en co - cultivos con células derivadas de la placenta que en los co - cultivos de células derivadas umbilicales.

El porcentaje de progenitores neurales diferenciados después de un co - cultivo con células derivadas umbilicales se cuantificó (Tabla 15 - 2). Las células derivadas umbilicales impulsaron significativamente el número de

oligodendrocitos maduros (MBP) (24.0% vs 0% en ambas condiciones). Adicionalmente, el co – cultivo incremento el número de astrocitos GFAP+ y neuronas TuJ1+ en el cultivo (47.2% y 8.7% respectivamente). Estos resultados fueron confirmados por la tinción de nestina indicando que el estado progenitor fue perdido después del co – cultivo (13.4% vs 71.4% bajo la condición de control 4).

Aunque la diferenciación también pareció ser influenciada por fibroblastos humanos adultos, aquellas células no pudieron promover la diferenciación de oligodendrocitos maduros ni pudieron generar una cantidad apreciable de neuronas. Aunque no fue cuantificado, los fibroblastos, sin embargo, parecieron mejorar la supervivencia de los progenitores neurales.

**Tabla 15 - 2.** Cuantificación de la diferenciación progenitora en co - cultivos de control vs. transwell con células derivadas umbilicales. (E=EGF, F=bFGF)

Anticuerpo	F+E / Umb [Cond.1]	F+E/F+E [Cond. 4]	F+E/removido [Cond. 5]
TuJ1	8.7 %	2.3 %	3.6 %
GFAP	47.2 %	30.2 %	10.9 %
MBP	23.0 %	0 %	0 %
Nestina	13.4 %	71.4 %	39.4 %

**Identificación de compuestos únicos.** Medios acondicionados de co – cultivos derivados umbilicales y de la placenta, junto con los controles apropiados (medio NPE ± 1.7 % de suero, medio de co – cultivos con fibroblastos), fueron examinados para detectar diferencias. Componentes potencialmente únicos fueron identificados y extirpados de sus geles 2D respectivos.

**Resumen.** Co-cultivos de células progenitoras neurales adultas con PPDCs umbilicales o de placenta resultaron en la diferenciación de aquellas células. Los resultados presentados en este ejemplo indican que la diferenciación de células progenitoras neurales adultas después de su co - cultivo con células derivadas umbilicales es particularmente efectivo. Específicamente, un porcentaje significativo de oligodendrocitos maduros fue generado en co - cultivos de células derivadas umbilicales. En vista de la falta de contacto entre las células derivadas umbilicales y los progenitores neurales, este resultado parece estar en función de factores solubles liberados de las células derivadas umbilicales (efecto trófico).

También se realizaron otras observaciones. Primero, hubieron muy pocas células en la condición de control donde EGF y bFGF fueron removidos. La mayoría de células murieron y en promedio, hubieron alrededor de 100 células o menos por pozo. Segundo, se espera que exista muy poca diferenciación en la condición de control donde se retenga a EGF y bFGF en el medio, puesto que normalmente es un medio de expansión. Aunque aproximadamente el 70% de las células retuvo su estado progenitor (nestina+), alrededor del 30% fueron GFAP+ (indicativo de astrocitos). Esto puede deberse al hecho de que aquella expansión significativa ocurrió durante el procedimiento en el cual el contacto entre progenitores indujo esta diferenciación (Song, H. et al. 2002. Nature (Naturaleza) 417: 29-32).

**EJEMPLO 16**

**Transplante de células derivadas de postparto**

Las células derivadas umbilicales y de placenta de postparto son útiles para terapias regenerativas. Se evaluó el tejido producido por las células derivadas de postparto (PPDCs) trasplantadas en ratones SCID con un material biodegradable. Los materiales evaluados fueron poliglactina no tejida, espuma 35/65 PCL/PGA hidrogel péptido auto ensamblable RAD16.

**Métodos y materiales**

**Cultivo celular.** Las células derivadas de la placenta y umbilicales fueron cultivadas en un medio de crecimiento (DMEM - de baja glucosa (Gibco, Carlsbad CA), 15% (volumen / volumen) de suero bovino fetal (Cat. #SH30070.03; Hyclone, Logan, UT), 0.001% (volumen / volumen) de betamercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), penicilina / estreptomina (Gibco) en matraces cubiertos de gelatina.

**Preparación de la muestra.** Se sembró 1 millón de células viables en 15 µl de Medio de Crecimiento en un diámetro de 5 mm en supercántigos no tejidos Vicryl de 2.25 mm de grueso (64.33 miligramos /cc; Lote#3547-47-1) o una espuma 35/65 PCL/PGA con un diámetro de 5 mm (Lote# 3415-53). Se les permitió a las células adherirse durante dos horas antes de agregar más medio de crecimiento para cubrir los supercántigos. Las células se cultivaron en los supercántigos durante la noche. También se incubaron en el medio células sin supercántigos.

Se obtuvieron péptidos auto ensamblables RAD16 (3D Matrix, Cambridge, MA bajo un acuerdo de transferencia de materiales) como un 1% (masa / volumen) de solución estéril en agua, que fue mezclada 1:1 con 1 x 10<sup>6</sup> células en un 10% (masa / volumen) de sacarosa (Sigma, St Louis, MO), 10mM de HEPES en un medio

modificado de Dulbecco (DMEM; Gibco) justo antes de usarse. La concentración final de células en el hidrogel RAD16 fue de  $1 \times 10^6$  células por cada 100  $\mu$ l.

MATERIAL DE PRUEBAS (N=4/Rx)

5

[0333]

10

15

1. Poliglactina no tejida +  $1 \times 10^6$  de células derivadas umbilicales
2. Espuma 35/65 PCL/PGA +  $1 \times 10^6$  células derivadas umbilicales
3. Péptido auto - ensamblable RAD 16 +  $1 \times 10^6$  células derivadas umbilicales
4. Poliglactina no tejida +  $1 \times 10^6$  células derivadas de la placenta
5. Espuma 35/65 PCL/PGA +  $1 \times 10^6$  células derivadas de la placenta
6. Péptidos auto - ensamblable RAD 16 +  $1 \times 10^6$  células derivadas de la placenta
7. Espuma 35/65 PCL/PGA
8. Poliglactina no tejida

20

**Preparación animal.** Los animales fueron manejados y mantenidos de acuerdo a los requerimientos actuales de la ley del bienestar animal. Se cumplió con las leyes públicas que se acaban de mencionar al adherirse a las regulaciones de bienestar animal (9 CFR) y conforme a los estándares promulgados en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, 7ma edición.

25

30

Ratones (*Mus Musculus*) / Fox Chase SCID / masculino (Harlan Sprague Dawley, Inc., Indianapolis, Indiana), cinco semanas de edad. Todas las personas manejaban los ratones SCID bajo una cubierta. Los ratones fueron pesados individualmente y anestesiados con una inyección intraperitoneal con una mezcla de 60 mg por kilogramo de KETASET (clorhidrato de ketamina, Aveco Co., Inc., Fort Dodge, Iowa) y 10 mg por kilogramo de ROMPUN (Xilacina, Mobay Corp., Shawnee, Kansas) y solución salina. Después de la inducción de la anestesia, toda la espalda del animal desde el área cervical dorsal hasta el área lumbosacra dorsal se afeitaba removiendo todo el pelo usando máquinas afeitadoras eléctricas para animal. Después de eso, esa área era refregada con diacetato de clorhexidina, enjuagado con alcohol, secado, y pintado con una solución de yodo acuoso de 1% de yodo disponible. Se aplicó ungüento oftálmico a los ojos para prevenir que se seque el tejido durante el período anestésico.

35

40

**Técnica de implantación subcutánea.** Se realizaron cuatro incisiones en la piel, cada una de aproximadamente 1 cm de largo, en el dorso de los ratones. Dos lugares craneales fueron ubicados transversalmente sobre la región torácica lateral dorsal, alrededor de 5 mm de caudal al filo interior palpado de la escápula, con uno a la izquierda y otro a la derecha de la columna vertebral. Otros dos fueron ubicados transversalmente sobre el área del músculo glúteo al nivel lumbar - sacro caudal, alrededor de 5 mm de caudal a la cresta ilíaca palpada, con uno en cada lado de la línea media. Los implantes fueron colocados aleatoriamente en estos lugares de acuerdo al diseño experimental. La piel fue separada del tejido conectivo subyacente para hacer un pequeño bolsillo y colocar el implante (o inyectar el RAD16) alrededor de 1 cm de caudal a la incisión. El material de pruebas apropiado fue implantado en el espacio subcutáneo. La incisión en la piel fue cerrada con broches metálicos.

45

50

**Alojamiento de los animales.** Los ratones fueron albergados individualmente en jaulas micro aislantes mientras duró el estudio a una temperatura que variaba entre 64° F a 79° F y una humedad relativa del 30% al 70%, y se mantenía un ciclo aproximado de 12 horas de luz / 12 horas de oscuridad. La temperatura y humedad relativa fueron mantenidas dentro de los rangos declarados en la mayor medida de lo posible. La dieta consistía de Chow 5058 irradiado para hocico de ratón (Purina Co.) y agua fue administrada ad libitum.

55

**Histología.** La piel e implantes extirpados fueron fijados con un 10% de formalina tamponada neutral (Richard-Allan Kalamazoo, MI). Muestras con tejidos supra yacentes y adyacentes fueron atravesados, procesados con parafinas, y pegados a la superficie del corte utilizando métodos de rutina. Las realizaciones de tejido de cinco micrones fueron obtenidas por micro tomos y pintadas con hematoxilina y eosina (Poly Scientific Bay Shore, NY) usando métodos de rutina.

60

### Resultados

65

Hubo un crecimiento interno mínimo de tejidos en las espumas (sin células) implantadas subcutáneamente en los ratones SCID después de 30 días. En contraste, había bastante tejido lleno en las espumas implantadas con células derivadas umbilicales o células derivadas de la placenta. Se observó algo de tejido que creció internamente en los supercántigos no tejidos de poliglactina. Los supercántigos no tejidos sembrados con células derivadas

umbilicales o de la placenta mostraron una deposición matricial incrementada y un mayor número de vasos sanguíneos maduros.

5 **Resumen.** Se sembraron discos no tejidos / de espuma absorbibles sintéticos (5.0 milímetros de diámetro por 1.0 milímetros de grosor) o hidrogel péptido auto - ensamblable ya sea con células derivadas umbilicales o de la placenta humanas e implantadas subcutáneamente bilateralmente en la región de la espina dorsal de los ratones SCID. Los resultados demostraron que las células derivadas de postparto pueden incrementar dramáticamente la formación de tejidos de buena calidad en supercántigos biodegradables.

## 10 **EJEMPLO 17**

### **El uso de células derivadas de postparto para la reparación de nervios**

15 Las lesiones de células ganglionares de la retina (RGC - Retinal ganglion cell) han sido usadas extensivamente como modelos para varias estrategias de reparación en mamíferos adultos CNS. Se ha demostrado que una división de los axones RGC de roedores adultos resultan en brotes abortivos (Zeng et al., 1995) y muerte progresiva de la población de células padre (Villegas-Perez et al., 1993). Muchos estudios han demostrado los efectos simuladores de varios factores exógenos y endógenos en la supervivencia de RGCs donde se cortó los axones y su regeneración (Yip y So, 2000; Fischer et al., 2001). Adicionalmente, otros estudios han demostrado que los trasplantes celulares pueden ser utilizados para promover la regeneración de varios axones de nervios separados (Li et al., 2003; Ramon-Cueto et al., 2000). Por lo tanto, estos y otros estudios han demostrado que la terapia que se basan en células puede ser utilizada para el tratamiento de desórdenes neurales que afectan la médula espinal, los nervios periféricos, los nervios de los pudendos, nervios ópticos u otras enfermedades / traumas debido a lesiones en los que haya ocurrido un daño nervioso.

25 Se han desarrollado péptidos auto - ensamblables (PuraMatrix™, patentes de Estados Unidos 5'670.483, 5'955.343, US/PCT aplicaciones US2002/0160471, WO02/062969) para actuar como supercántigos para la adjunta acción de células A células encapsuladas en 3-D, células tapadas en coberturas 2-D, o cómo micro portadores en cultivos de suspensión. Los cultivos celulares tridimensionales han requerido ya sea materiales derivados de animales (extracto de sarcoma de ratón), con su reproducibilidad inherente y tejidos de señalización celular, o supercántigos sintéticos mucho más grandes, que no pueden aproximar la escala física nanométrica y atributos químicos del ECM. RAD 16 (NH<sub>2</sub>-(RADA)<sub>3</sub>-COOH) y KLD (NH<sub>2</sub>-(KLDL)<sub>3</sub>-COOH) nativos son sintetizados en pequeños (RAD16 es de 5 nanómetros) fragmentos de oligopéptidos que se auto ensamblan en nanofibras en una escala similar a la de la matriz extracelular in vivo (ECM) (3D Matrix, Inc Cambridge, MA). El auto ensamblaje es iniciado por cationes mono o divalentes encontrados en el medio de cultivo o el entorno fisiológico. En los protocolos descritos en este ejemplo, se utilizó RAD 16 como un micro portador de los implantes de células postparto al defecto ocular. En este ejemplo, se demuestra que los trasplantes de las células derivadas de postparto (PPDCs) pueden suministrar eficacia en un modelo de regeneración axonal del nervio óptico de rata adulta.

### 40 **Métodos y materiales**

45 **Células.** Cultivos de PPDCs (umbilicales y placentarias) de humano adulto y células de fibroblastos (pase 10) fueron expandidos durante un pase. Todas las células se sembraron inicialmente a 5000 células por centímetro cuadrado en matraces T 75 cubiertos con gelatina en un medio de crecimiento con 100 unidades por mililitro de penicilina, 100 µg por mililitro de estreptomycin, 0.25 microgramos por mililitro de anfotericina B (Invitrogen, Carlsbad, CA). En el pase 11 las células fueron tripnizadas y se determinó la viabilidad usando tinción de tripano azul. Brevemente, 50 µl de suspensión celular fueron combinados con 50 µl de 0.0 4% (masa / volumen) de tripano azul (Sigma, St. Louis MO) y el número de células viables, se estimó usando un hemocitómetro. Las células fueron lavadas tres veces en un medio suplementario L15 libre de Leibovitz (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células fueron suspendidas entonces a una concentración de 200.000 células en 25 µl de RAD-16 (3DM Inc., Cambridge, MA) que fue taponado y hecho isotónico de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Se agregó 100 µl del medio suplementario libre de L-15 de Leibovitz sobre la suspensión celular / matricial para mantenerla mojada hasta su uso. Estos cultivos celulares / matriciales fueron mantenidos bajo condiciones atmosféricas estándar hasta que ocurrió el trasplante. En el momento del trasplante el medio que estaba en exceso fue removido.

55 **Animales y cirugía.** Se utilizaron ratas hembras Long Evans (220 - 240 g de peso corporal). Bajo anestesia de tribromoetanol intraperitoneal (20 miligramos / 100 gramos de peso corporal), se expuso el nervio óptico, y se hizo una incisión en la envoltura óptica intraorbitalmente a aproximadamente 2 mm del disco óptico, el nervio fue levantado de la envoltura para permitir completar un corte transversal con tijeras finas (Li et al., 2003). La totalidad del corte transversal fue confirmado visualmente al ver la separación completa de los troncos proximal y distal. El grupo de control consistió de ratas lesionadas sin trasplantes. En las ratas con trasplantes se sembraron células entre los tocones proximal y distal células de postparto cultivadas sembradas en RAD-16 usando un par de micro pinzas. Aproximadamente 75.000 células en RAD-16 fueron implantadas en el nervio óptico separado. Las células / matriz fueron untadas en el corte de separación usando un par de micropinzas finas. La envoltura dividida del nervio óptico fue cerrada con un monofilamento de nylon negro 10/0 (Ethicon, Inc., Edinburgh, UK). Por lo tanto, la apertura

fue cerrada empatando los extremos proximal y distal del corte del nervio poniéndolos en proximidad el uno con el otro.

Después que se realizaron las inyecciones de células, se les inyectó a los animales dexametasona (2 mg por kilogramo) durante 10 días después del trasplante. Durante el estudio, se administró a los animales ciclosporina A oral (210 mg por litro de agua bebida; resultando en una concentración sanguínea: de 250 a 300 µg por litro) (Bedford Labs, Bedford, Ohio) desde dos días antes del trasplante hasta el final del estudio. La comida y el agua estuvieron disponible ad libitum. Los animales fueron sacrificados de 30 a 60 días después del trasplante.

**Aplicación CTB.** Tres días antes de que los animales fuesen sacrificados, con anestesia, una micro pipeta de vidrio con una punta de 30 a 50 µm fue insertada tangencialmente a través de la esclera atrás de los lentes, y dos porciones de cuatro a 5 µl de una solución acuosa con 1% de toxina rastreadora de cólera retrógrada de (CTB - cholera toxin B) (List Biologic, Campbell, CA) se inyectó al vitreo. Los animales fueron perfundidos con fijadores y los nervios ópticos fueron recolectados con el mismo fijador durante una hora. Los nervios ópticos fueron transferidos a sacarosa durante la noche. Se incubaron realizaciones de criostato de 20 µm en 0.1 molar de glicina durante 30 minutos y se bloqueó en una solución PBS que contenía 2.5 por ciento de albúmina de suero bovino (BSA) (Boeringer Mannheim, Mannheim, Alemania) y 0.5 por ciento de tritón X-100 (Sigma, St. Louis, MO), seguido de una solución que contenía anticuerpos de cabra anti - CTB (List Biologic, Campbell, CA) diluidos 1:4000 en un PBS que tenía un 2% de suero de conejo normal (NRS) (Invitrogen, Carlsbad, CA), un 2.5 por ciento de BSA, y un 2% de tritón X-100 (Sigma, St. Louis, MO) en PBS, incubado en anticuerpos IgG biotinilados de conejo anti cabra (Vector Laboratories, Burlingame, CA) diluidos 1:200 en un 2% de tritón X100 en PBS durante dos horas a la temperatura del cuarto. Esto fue seguido por una tinción en 1:200 de estreptavidina verde (Alexa Flour 438; Molecular Probes - Sondas Moleculares, Eugene, OR) en PBS durante dos horas a la temperatura del cuarto. Las realizaciones pintadas fueron lavadas entonces en PBS y contra tintadas con yoduro de propidio para microscopía confocal

**Preparación histológica.** Brevemente, cinco días después de la inyección CTB, las ratas fueron perfundidas con un 4% de paraformaldehído. Se les dio a las ratas 4 cm<sup>3</sup> de uretano y después fueron perfundidas con PBS (0.1 mol) y entonces con un 4% de paraformaldehído. La médula espinal fue cortada y el hueso fue removido de la cabeza para exponer el cóliculo. El cóliculo fue entonces removido y colocado en un 4% de paraformaldehído. El ojo fue removido al cortar alrededor de la parte exterior del ojo yendo hacia atrás lo más posible. Se tomó cuidado de no cortar el nervio óptico que está en la parte inferior del ojo. El ojo fue removido y los músculos fueron cortados exponiendo el nervio óptico el cual fue colocado entonces en un 4% de para formaldehído.

### Resultados

**Lesiones individuales.** Un mes después de la segmentación retrotubular del nervio óptico, se identificaron varios axones marcados como CTB en el segmento del nervio junto a la retina. En los 200 micrómetros más cercanos al corte, se observó que axones emitieron varios colaterales en ángulos rectos al eje principal y terminaban como un enredo de neuomas en la superficie del corte. En este corte entre los troncos próximos y distales, se observó que el vacío se conectó progresivamente a un segmento de tejido conectivo vascularizado de 2 - 3 milímetros; sin embargo, no se observó que avance ningún axón en esta área de conexión. Por lo tanto, en los animales que solo recibieron una lesión no se observó que ningún crecimiento axonal alcance el tronco distal.

**Trasplante RAD-16.** Después del trasplante de RAD-16 al corte, se observó un crecimiento interno de tejido conectivo vascularizado. Sin embargo, no se observó ningún crecimiento axonal entre los troncos proximales y distales. Los resultados demuestran que la aplicación de RAD-16 por sí sola no es suficiente para inducir una regeneración axonal en esta situación.

**Trasplante de células derivadas de postparto.** El trasplante de células derivadas de postparto en nervio óptico seccionado estimuló el nuevo crecimiento del nervio óptico. Parte del nuevo crecimiento también fue observado en condiciones donde células fibroblastos fueron implantadas, aun cuando esto fue mínimo en comparación con el nuevo crecimiento observado con el trasplante de células derivadas de placenta. El nuevo crecimiento de nervio óptico fue observado en 4 de 5 de animales trasplantados con células derivadas de placenta, 3 de 6 de animales trasplantados con fibroblastos dermales adultos y en 1 de 4 de animales trasplantados con células derivadas de cordón umbilical. En las situaciones en las que se observó el nuevo crecimiento, el etiquetado por CTB confirmó la regeneración de axones en células ganglionares de la retina, lo que se demostró al penetrar a través de la zona de trasplante. También se realizó un proceso de etiquetado por GFAP para determinar el nivel de gliosis. La expresión GFAP se intensificó en el tronco proximal (final de la neurona afectada) observándose cierto nivel de inmunocoloración a través del injerto reinervado.

**Resumen.** Estos resultados demuestran que las células humanas adultas derivadas de postparto trasplantadas son capaces de estimular y guiar la regeneración de axones cortados en células ganglionares de la retina.

### Referencias para Ejemplo 17

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

## EJEMPLO 18

### 10 Uso de células postparto en el tratamiento de retinitis pigmentaria

15 Actualmente no existe ningún tratamiento real para desórdenes que causen la ceguera que se deriven de la degeneración en la retina. La pérdida de foto receptores es un resultado de apoptosis o degeneración secundaria que conlleva a una deterioración progresiva de la vista, y finalmente a la ceguera. Las enfermedades en las que esto ocurre incluyen degeneración macular relacionada con la edad (AMD - age-related macular degeneration) y retinitis pigmentaria (RP). Se asocia más comúnmente a RP con una mutación genética, que contribuye a la muerte celular de los foto receptores.

20 Los foto receptores de la retina y el epitelio de los pigmentos de la retina adyacentes forman una unidad funcional. El modelo de rata del Royal College of Surgeons (RCS – Universidad Real de Cirujanos) presenta un defecto de la quinasa receptora de tirosina (Merkt) que afecta el segmento exterior de la fagocitosis, lo que conlleva a la muerte celular de los foto receptores. (1). El trasplante de células epiteliales del pigmento de la retina (RPE - retinal pigment epithelial) al espacio sub retinal de las ratas RCS limitó el progreso de la pérdida de fotosreceptores y preservó la función visual (2). En este ejemplo, se demuestra que las células derivadas de postparto pueden ser utilizadas para promover el rescate de foto receptores y por lo tanto preservarlos en un modelo RCS.

### 25 Métodos y Materiales

30 **Trasplantes celulares.** Cultivos de células umbilicales, placentarias y fibroblastos adultas (pase 10) fueron expandidas durante un pase. Todas las células se sembraron inicialmente a 5000 células por centímetro cuadrado en matraces T 75 cubiertos con gelatina en medios de crecimiento. Para pases subsiguientes, todas las células fueron tratadas de la siguiente manera. Después de la tripnización, las células viables fueron contadas después de colorearlas con tripano azul. Brevemente, se combinaron 50 µl de suspensión celular con 50 µl de 0.04% peso/volumen de tripano azul (Sigma, St. Louis MO) y se estimó el número de células viables usando un hemocitómetro. Las células fueron tripnizadas y lavadas tres veces en un suplemento gratuito de medio DMEM: de baja glucosa (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los cultivos de células humanas umbilicales, placentarias y fibroblastos en el pase 11 fueron tripnizadas y lavadas dos veces en un medio L-15 de Leibovitz (Invitrogen, Carlsbad, CA). Para el procedimiento de trasplante, ratas RCS distróficas fueron anestesiadas con xilacina - ketamina (1 mg por kilogramo i.p. De la siguiente mezcla 2.25 ml de xilacina a 20 mg por mililitro, 5 ml de ketamina a 100 mg por mililitro, y 0.5 mililitros de agua destilada) y sus cabezas aseguradas mediante una barra de nariz. Las células desprovistas de suero fueron re - suspendidas ( $2 \times 10^5$  células por inyección) en 2 µl de Leibovitz, medio L-15 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y trasplantadas usando una pipeta fina de vidrio (diámetro en yerno de 75 a 150 micrómetros). Las células se colocaron en el espacio sub retinal dorso temporal de ratas RCS distrófico - pigmentadas de tres semanas de edad bajo efectos de anestesia (total N = 10/tipo celular).

45 Las células se inyectaron unilateralmente en el ojo derecho, mientras que el ojo izquierdo fue inyectado sólo con un medio portador (control falso; medio L-15 de Leibovitz). La viabilidad de las células residuales de trasplante se mantuvo sobre el 95% tal como se evaluó por la exclusión de tripano azul al final de la sesión de trasplante. Después de que se realizaron las inyecciones celulares, se les inyectó a los animales dexametasona (2 mg por kilogramo) durante 10 días después del trasplante. Mientras duró el estudio, se mantuvo a los animales con ciclosporina A oral (210 mg por litro de agua bebida; lo que resultó en una concentración sanguínea: de 250 a 300 µg por litro) (Bedford Labs, Bedford, Ohio) desde dos días antes del trasplante hasta el final del estudio. La comida y el agua estuvieron disponibles ad libitum. Los animales fueron sacrificados después de 60 o 90 días después de la operación, siendo algunos animales sacrificados antes para su evaluación histológica de cambios al corto plazo asociados con el trasplante celular.

60 **Registros ERG.** Después de la adaptación de la oscuridad durante la noche, los animales fueron preparados para los registros ERG bajo una luz leve roja, como se describió previamente (3). Brevemente, bajo anestesia (con una mezcla de 150 miligramos por kilogramo i.p. de ketamina, y 10 mg por kilogramo i.p. de xilacina) la cabeza fue asegurada con un sostenedor estereotáxico de la cabeza y se monitoreo la temperatura del cuerpo por medio de un termómetro rectal el cual se mantuvo a 38° C usando una manta homeotérmica. Las pupilas se dilataron usando partes iguales 2.5% de Fenilefrina y 1% de tropicamida superficiales. Se utilizó anestesia superficial con 0.75 por ciento de Bupivacaína para prevenir cualquier reflejo córneo y una gota de 0.9 por ciento de sustancia salina se aplicaba frecuentemente a la córnea para prevenir su deshidratación y permitir un contacto eléctrico con el electrodo grabador (bucle de alambre dorado). Una aguja medidora de 25 insertada bajo el cuero cabelludo, entre los dos ojos, sirvió como el electrodo de referencia. El sistema UTAS-3000 de LKC Technologies (Gaithersburg, MD)

suministro la amplificación (a una frecuencia de 1-1000 Hz, sin filtración de sonidos), presentación de estímulos, y la adquisición de datos. Los ERGs fueron grabados a los 60 y 90 días de edad de los grupos celulares umbilicales y solamente a los 60 días de edad de los grupos placentarios y de fibroblastos.

5 **Grabaciones mixtas de ondas a y b.** Para la cuantificación de ondas B grabadas en la oscuridad, grabaciones que consistían de presentaciones de un destello (con una duración de 10  $\mu$ s), repetidos de tres a cinco veces para verificar la confiabilidad de la respuesta y mejorar la tasa de señal – a – sonido, si fuese necesario. Los estímulos fueron presentados a seis intensidades crecientes en pasos de una unidad logarítmica que variaban desde - 3.6 hasta 1.4 Candela logarítmica por metro cuadrado en luminancia. Para minimizar el potencial de manchar las varillas la luminancia se elevó de 10 segundos hasta la intensidad más baja de estímulo a dos minutos como la intensidad más alta de estímulo. La amplitud máxima de la onda B se definió como aquella obtenida de las series de la intensidad del destello, sin importar la intensidad del estímulo. El verdadero  $V_{max}$  proveniente del adaptar los datos con una curva Naka - Rushton no fue utilizada porque las respuestas ERG fueron a menudo erráticas a niveles más altos de luminancia en animales distróficos y mostraron tendencias a respuestas deprimidas alrededor de 0.4 y 1.4 candela logarítmica por metro cuadrado. Para determinar la edad a la cual los componentes ERG fueron obtenidos o perdidos, se utilizaron los criterios de amplitud: 20 microV para bandas a y b, y 10 microV para respuestas similares a STR. La amplitud de la onda b fue medida de un pico negativo de banda a hasta la cima positiva de la banda b, y no hasta el pico de las oscilaciones, que podían exceder la cima de la onda b (4).

20 **Aislamiento de las respuestas de varillas y de conos.** El protocolo de doble destello fue utilizado para determinar el aislamiento de respuestas de varillas y de conos (5). Una sonda de destellos fue presentada un segundo después de acondicionar el destello, utilizando una característica específica del sistema UTAS-3000 (LKC Technologies) con una calibración Ganzfeld; que aseguraba una recarga completa del estimulador bajo las condiciones utilizadas. El rol del acondicionamiento del destello en el procedimiento era el saturar momentáneamente a las varillas para que estas no fuesen responsivas al destello de la sonda. Se tomó en cuenta como una respuesta a la sonda de destellos como un reflejo conducido por la actividad del cono. Una onda b manejada por la varilla se obtuvo al sustraer la respuesta manejada por el cono de la respuesta mixta (obtenida después de la presentación individual de un destello de la sonda, en otras palabras, aquellas no precedidas por ningún destello de acondicionamiento).

30 **Evaluación operativa.** Las pruebas de la sensibilidad fisiológica de la retina fueron realizadas para demostrar una respuesta de la retina a luces ligeras. Los animales fueron anestesiados con una dosis de recuperación de uretano a 1.25 gramos por kilogramo i.p. La evaluación fisiológica en los animales fue probada después del injerto en animales a los 90 días al registrar actividad extracelular de múltiples unidades en el colículo superior a la iluminación de los campos receptores visuales respectivos (6). Éste procedimiento se repitió para los 20 puntos independientes (que tenían un alejamiento de 200 mm, con cada paso correspondiendo aproximadamente a 10 - 150 desplazamientos en el campo visual), cubriendo el campo visual. Los umbrales visuales fueron medidos como el incremento de intensidad en el fondo y cuando se mantenían a 0.02 candela logarítmica por metro cuadrado (unidad de luminiscencia) [por lo menos 2.6 unidades logarítmicas por debajo de la saturación de la varilla (7)], requeridos para la activación de las unidades en los 200  $\mu$ m superficiales del colículo superior. Los parámetros de respuesta fueron comparados entre los ojos trasplantados y los de control que sólo recibieron únicamente el transportador.

45 **Histología.** Los animales fueron sacrificados con una sobredosis de uretano (12.5 gramos por kilogramo). La orientación del ojo se mantuvo al colocar una estructura 6.0 a través del músculo recto superior antes de la enucleación. Después de hacer una incisión en la córnea, los ojos fueron fijados con 2.5 por ciento de paraformaldehído: 2.5% de glutaraldehído, 0.01% de ácido pícrico y 0.1 M de amortiguador cacodilato (pH 7.4) (Sigma, St. Louis, MO). Después de la fijación, la córnea y los lentes fueron removidos al cortar alrededor del cuerpo ciliar. Un corte pequeño se realizó en la periferia de la retina dorsal antes de la remoción del recto superior para asistir a mantener la orientación. Las retinas fueron pos - fijadas entonces en un 1% de tetróxido de osmio durante una hora. Después de la deshidratación por medio de una serie de alcoholes al epoxipropano, las retinas fueron adheridas a una resina de adherencia TAAB (TAAB Laboratories, Alderminster, UK). Las realizaciones semi delgadas fueron tinturadas con un 1% de toluidina azul en un 1% de amortiguadora de borato y las realizaciones ultra delgadas fueron contrastadas con un acetato de pura Nilo y un citrato de plomo.

55 Para tinciones Nissl, las realizaciones fueron tinturadas con un 0.75 por ciento de violeta de cresilo (cresyl violet) (Sigma, St. Louis, MO) después de lo cual fueron deshidratadas dos veces por medio de alcoholes con un grado de 70, 95 y 100%. Luego fueron colocados en xileno (Sigma, St. Louis, MO), enjuagados con PBS (pH 7.4) (Invitrogen, Carlsbad, CA), cubiertos e implementados con montaje DPX (Sigma, St. Louis, MO).

## 60 **Resultados**

65 **Grabaciones ERG.** Los animales que recibieron las inyecciones celulares umbilicales exhibieron una preservación relativa de las propiedades visuales de respuesta en los 60 y 90 días después de la operación (Tabla 18 - 1). La respuesta observada en estos animales fue mayor que la vista en los animales tratados con placenta, fibroblastos o sustancia falsa. Los trasplantes de células placentarias (n = 4) a 60 días no mostraron ninguna mejora

en ondas a ( $20 \pm 20$ ) vs. los controles falsos (0), pero mostraron algo de mejoras en las ondas mixtas b ( $81 \pm 72$ ) versus los controles falsos ( $1.5 \pm 2$ ), y una buena mejora en las ondas b cónicas ( $50 \pm 19$ ) versus los controles falsos ( $7 \pm 7$ ), y la contribución de varillas (30%) versus los controles falsos (0). Estos resultados indicaron alguna mejora en la respuesta visual cuando se los comparaba con los controles falsos.

Los animales a los que se les trasplantó células umbilicales ( $n = 6$ ) demostraron una buena mejora en todas las medidas probadas de resultados a los 60 días (Tabla N5-1), onda a ( $27 \pm 11$ ) versus los controles falsos (0), onda mixta b ( $117 \pm 67$ ) versus los controles falsos ( $18 \pm 13$ ), onda b cónica ( $55 \pm 25$ ) versus los controles falsos ( $28 \pm 11$ ), y contribución de varillas ( $49 \pm 16 \%$ ) versus controles falsos ( $6 \pm 7 \%$ ). Adicionalmente, a los 90 días, respuestas mejoradas fueron medidas en dos animales examinados, con medidas incluyendo: onda a ( $15 \pm 7$ ) versus los controles falsos (0), ondas mixtas b ( $37 \pm 15$ ) versus controles falsos (0), ondas cónicas b ( $16 \pm 11$ ) versus controles falsos ( $7 \pm 5$ ), y contribución de varillas ( $58 \pm 39 \%$ ) versus controles falsos (0%). Estos resultados indican que las respuestas visuales fueron mejoradas en los animales a los que se les trasplantó células umbilicales con evidencia de preservación de fotoreceptores en el modelo RCS. Aunque se observó una disminución de respuesta a ERG en el día 90, su preservación de la función visual en comparación con los animales tratados con la sustancia falsa fue buena.

En contraste con las células umbilicales o placenta varias, los trasplantes de fibroblastos no mostraron ninguna mejora en los parámetros probados, con valores menores o iguales a los animales tratados con la sustancia falsa.

**Tabla 18-1: datos ERG**

Grupo	Onda - a		Onda mixta b		Onda cónica b		% de contribución de varillas	
	Sin Tratamiento	Con Tratamiento	Sin Tratamiento	Con Tratamiento	Sin Tratamiento	Con Tratamiento	Sin Tratamiento	Con Tratamiento
Falsa 60d	0	0	$7 \pm 9$	0	$23 \pm 5$	$12 \pm 16$	N/A	N/A
1 (n=4) 60d	0	$20 \pm 20$	$1.5 \pm 2$	$81 \pm 72$	$7 \pm 7$	$50 \pm 19$	N/A	30
3 (n=6) 60d	0	$27 \pm 11$	$18 \pm 13$	$117 \pm 67$	$28 \pm 11$	$55 \pm 25$	$6 \pm 7$	$49 \pm 16$
3 (n=6) 90d	0	$15 \pm 7$	0	$37 \pm 15$	$7 \pm 5$	$16 \pm 11$	0	$58 \pm 39$

N.B. Falsa = control (solamente medio), 1 = trasplante celular placentario, 3 = trasplante celular umbilical

**Histología.** Después de los trasplantes, no se obtuvo evidencia histológica de una reacción inflamatoria ni tampoco se observaron células inmunológicas que se hayan infiltrado en las realizaciones tincionadas de Nissl en los grupos celulares de postparto. Sin embargo, los implantes de fibroblastos resultaron en muertes de animales ( $n = 7$ ) y hubieron indicaciones de etapas tempranas de respuestas inflamatorias. Histológicamente en el día 90 se demostró el rescate anatómico de los fotoreceptores en los animales que se les trasplantó células umbilicales. Los fotoreceptores formaron una capa gruesa separada por un vacío desde la capa nuclear interna, hecha de células de la retina. En comparación, el ancho de la capa exterior en el control de líquido falso fue, en el mejor de los casos, una capa no continua al contrario de un grosor de alrededor de cinco células en el ojo injertado. En comparación a un animal normal esta es marginalmente más de la mitad del grosor de capas celulares fotoreceptoras que se observan normalmente.

**Evaluación Funcional.** Se monitoreo la eficacia de los trasplantes para prevenir la pérdida visual al evaluar las respuestas electro fisiológicas en dos animales. El umbral de la respuesta de sensibilidad a la luz fue usado para definir el área del rescate del campo visual en los ojos a los que se les inyectó la sustancia falsa de control vs. los ojos a los que se les trasplantó las células umbilicales. En ratas no distróficas, los umbrales visuales nunca excedieron 0.5 candela logarítmica por metro cuadrado sobre el fondo. En ratas distróficas no operadas, los umbrales tienen usualmente una magnitud de 4 unidades de candela logarítmica por metro cuadrado (8). En contraste, en ratas distróficas inyectadas con suero falso que no fueron operadas, los umbrales estuvieron alrededor de 2.9 - 4.9 unidades logarítmicas de candela por metro cuadrado con un umbral promedio de 4.0 unidades logarítmicas de candela por metro cuadrado, en algunos casos no se pudo obtener ningún registro. Por lo tanto, las ratas a las que se les inyectó la sustancia falsa mostraron un rescate funcional altamente localizado en la retina temporal. Sin embargo, a las ratas a las que se les trasplantó el material umbilical humano mostraron, sustancialmente, niveles más altos de preservación visual con umbrales que variaban desde 0.8 hasta 2.1 unidades logarítmicas de candela por m cuadrado con un promedio de umbrales de 1.3 unidades logarítmicas de candela por metro cuadrado.

**Resumen.** El trasplante de células umbilicales en ratas RCS distróficas demostró preservar los fotoreceptores. En un menor grado esta respuesta también fue vista después de los trasplantes con las células placentarias aunque una mejora en ondas A no fue vista. En este modelo degenerativo, uno esperaría que la onda A desapareciera en los primeros 30 a 60 días y que la onda B desaparezca en los primeros tres meses. Por lo tanto, las ondas a retenidas indican que la función real y normal de la varilla se preservó. La contribución de la varilla a las

ondas B sugiere que una función anormal de la varilla todavía es posible. La onda B sostenida sin varilla mide hasta que nivel la función cónica se preserva, lo cual es una verdadera medida de la visión. Por lo tanto, el nivel de mejoras evaluado fisiológica y anatómicamente después del trasplante umbilical se define correctamente aquí. Las medidas ERG suministran una evaluación de la función visual después de la pérdida de los foto receptores, indicando cambios en actividad eléctrica en la retina. Sin embargo, ERG no suministra información directa de la capacidad de formar imágenes. La medida de los umbrales de sensibilidad colicular usados en este estudio suministra una indicación de la preservación relativa de los campos visuales. La importancia de esta medida se basa en una correlación entre las cantidades de rescate funcional y preservación anatómica y que los datos recolectados, se comparan con pruebas visuales del campo periférico en los humanos (9). El trasplante demostró un retraso en el proceso de la enfermedad en los animales examinados. Por lo tanto, los resultados aquí presentados demuestran una evidencia clara de la eficacia funcional de injertar PPDCs humanos en el espacio sub retinal, y que ocurre un rescate en la región general donde se ubican las células injertadas.

**Referencias del ejemplo 18**

**[0370]**

1. D'Cruz P.M. et al., 2000, Hum Mol Genet. 9: 645-651.
2. Li, L.X. & Turner, J.E., 1988, Exp Eye Res. 47: 911-917.
3. Sauve, Y. et al., 2004, Vision Res. 44: 9-18
4. Nusinowitz, S. et al., 1999, Ridder, Invest Ophthalmol Vis Sci. 40: 2848-2858.
5. Nixon, P.J. et al., 2001, Clin Experiment Ophthalmol. 29:193-196.
6. Lund, R.D. et al., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 98: 9942-9947.
7. Siminoff, R. & Kruger, L., 1968, Exp Neurol. 20: 403-414.
8. Blakema, G.W. & Drager, U.C., 1991. Visual Neuroscience (Neurociencia Visual). 6: 577-585.
9. Beck, R.W. et al., 1985, Ophthalmology (Oftalmología) 92: 77-82.

Esta invención no se limita a las realizaciones y ejemplos descritos anteriormente. Puede tener variaciones y modificaciones dentro del enfoque de las declaraciones adjuntas.

**LISTA DE SECUENCIAS**

- <110> Ethicon, Incorporated  
Mistry, Sanjay  
Messina, Darin J.  
Harris, Ian Ross  
Harmon, Alexander M.  
Kihm, Anthony J.  
Seyda, Agnieszka  
Yi, Chin-Feng  
Gosiewska, Anna
- <120> REPARACION Y REGENERACION DE TEJIDO OCULAR USANDO CELULAS DERIVADAS DEL POSTPARTO
- <130> CBAT-0017
- <150> US 60/483,264  
<151> 2003-06-27
- <160> 10
- <170> PatentIn versión 3.2
- <210> 1  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- <220>  
<223> Constructo Sintético
- <400> 1  
gagaaatcca aagagcaaat gg 22

5  
 <210> 2  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Constructo Sintético

10  
 <400> 2  
 agaatggaaa actggaatag g 21

15  
 <210> 3  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Constructo Sintético

20  
 <400> 3  
 tcttcgatgc ttcggattcc 20

25  
 <210> 4  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

30  
 <220>  
 <223> Constructo Sintético

<400> 4  
 gaattctcgg aatctctggt g 21

35  
 <210> 5  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

40  
 <220>  
 <223> Constructo Sintético

<400> 5  
 ttacaagcag tgcagaaaac c 21

45  
 <210> 6  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

50  
 <220>  
 <223> Constructo Sintético

<400> 6  
 agtaaacatt gaaaccacag cc 22

55  
 <210> 7  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

60  
 <220>  
 <223> Constructo Sintético

65  
 <400> 7  
 tctgcagctc tgtgtgaagg 20

# ES 2 600 555 T3

5  
<210> 8  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
  
<220>  
<223> Constructo Sintético  
  
10  
<400> 8  
cttcaaaaac ttctccaca cc 22  
  
<210> 9  
<211> 17  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
  
<220>  
<223> Constructo Sintético  
  
20  
<400> 9  
cccacgccac gctctcc 17  
  
<210> 10  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
  
<220>  
<223> Constructo Sintético  
  
30  
<400> 10  
tcctgtcagt tgggtctcc 19  
  
35  
  
40  
  
45  
  
50  
  
55  
  
60  
  
65

**Reivindicaciones**

- 5 **1.** Células multipotentes o pluripotentes aisladas del cordón umbilical humano para su uso en el tratamiento de una condición degenerativa ocular en un pacient, donde las células se pueden obtener del tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre y donde las células tienen las siguientes características:
- 10 a. potencial de experimentar al menos 40 duplicaciones en cultivo;  
 b. unión y expansión en un recipiente de cultivo de tejido recubierto o sin recubrir, en donde el recipiente de cultivo de tejido recubierto comprende un recubrimiento de gelatina, laminina, colágeno, poliornitina, vitronectina o fibronectina;  
 c. producción de vimentina y actina del músculo liso alfa;  
 d. producción de cada uno de CD10, CD13, CD44, CD73, HLA-A,B,C, PDGFr-alfa y CD90 como se detectan por citometría de flujo;  
 15 e. expresión aumentada de genes endógenos que codifican interleucina 8; reticulon 1; ligando 1 de quimiocinas (motivo C-X-C); ligando 3 de quimiocinas (motivo C-X-C); ligando 6 de quimiocinas (motivo C-X-C) y proteína 3 inducida por el factor de necrosis tumoral alfa en relación a la expresión endógena de interleucina 8, reticulon 1, ligando 1 de quimiocinas (motivo C-X-C); ligando 3 de quimiocinas (motivo C-X-C); ligando 6 de quimiocinas (motivo C-X-C) y proteína 3 inducida por el factor de necrosis tumoral alfa en una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal, o una célula de la médula ósea de las crestas ilíacas, como **se caracterizan por** matriz de oligonucleótidos;  
 f. falta de producción de CD31, CD34, CD45, CD 117 y CD141 como se detectan por citometría de flujo;  
 g. son capaces de auto-renovarse y expandirse;  
 h. crecimiento en alrededor del 5% a alrededor del 20% de oxígeno;  
 25 i. requieren L-valina para el crecimiento;  
 j. carecen de expresión de HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86, B7-H2, HLA-G y CD 178 como se detectan por citometría de flujo;  
 k. expresión de PD-L2 como se detecta por citometría de flujo;  
 l. secreción de MCP-1, IL-6, GCP-2, IL-8, TIMP1, TPO, KGF, HGF, FGF, HBEGF y BDNF como se detectan por ELISA;  
 30 m.falta de secreción de SDF-1 alfa, VEGF, TGF-beta2, ANG2 y PDGFbb como se detectan por ELISA; y  
 n. una disminución en la expresión de los genes siguientes en relación a una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal, o una célula de de la médula ósea de las crestas ilíacas como se ensayan por micromatriz: caja homeótica 2 de la baja estatura; proteína 2 de choque térmico de 27 kDa; ligando 12 de quimiocina (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células del estroma); elastina; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); caja homeótica 2 de mesénquima; homólogo 1 de caja homeótica de "sine oculis"; cristalina, alfa B; activador de morfogénesis 2 asociado a "dishevelled"; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralin 1; tetranectina; dominio tres de homología con src (SH3) y rico en cisteínas; gen 1 de translocación de linfocitos B, antiproliferativa; colesterol 25-hidroxilasa; factor de transcripción 3 relacionado con el enanismo; proteína hipotética FLJ23191; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de procolágeno C-endopeptidasa; homólogo 7 de "frizzled"; gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C; proteína de caja homeótica iroquois 5; hefaestina; integrina, beta 8; glicoproteína 2 de vesícula sináptica; ADNc FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor 1 similar al receptor de citocinas; canal de potasio activado por calcio de conductancia intermedia/baja, subfamilia N, miembro 4; proteína DKFZP586L151; coactivador de la transcripción con motivo de unión a PDZ (TAZ); homólogo 2 de caja homeótica de "sine oculis"; proteína KIAA1034; respuesta de crecimiento precoz 3; caja homeótica de "distal less" 5; proteína hipotética FLJ20373; familia 1 de aldo-ceto reductasas, miembro C3 (3-alfa hidroxesteroide deshidrogenasa, tipo II); biglicano; fibronectina 1; proencefalina; integrina, tipo beta 1 (con dominios de repetición similares a EGF); clon de ADNc EUROIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor de péptido natriurético C/guanilato ciclasa C (receptor del péptido atrial natriurético C); proteína hipotética FLJ14054; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222); proteína de membrana asociada a vesícula 5; proteína 1 de la matriz extracelular tipo fibulina que contiene EGF; similar a proteína 3 de interacción con BCL2/adenovirus E1B de 19 kDa; proteína 1 de unión a AE; polipéptido 1 de la subunidad VIIa de la citocromo c oxidasa (músculo); neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; y proteína 2 de unión al factor de crecimiento insulinoide, 36 kDa.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 2.** Las células para el uso de la reivindicación 1, en donde la célula mantien un cariotipo normal con los pases.
- 3.** Las células para el uso de la reivindicación 1, en donde la condición degenerativa ocular es una condición degenerativa ocular aguda.
- 60 **4.** Las células para el uso de la reivindicación 3, en donde la condición degenerativa ocular aguda es un trauma cerebral, trauma del nervio óptico o lesión ocular.
- 5.** Las células para el uso de la reivindicación 1, en donde la condición degenerativa ocular es una condición degenerativa o crónica.
- 65

- 5 **6.** Las células para el uso de la reivindicación 5, en donde la condición degenerativa ocular crónica o progresiva es degeneración macular, retinitis pigmentosa, retinopatía diabética, glaucoma o deficiencia de células epiteliales limbares.
- 7.** Las células para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde las células se pueden obtener por digestión enzimática de tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre con colagenasa, dispasa y hialuronidasa.
- 10 **8.** Las células para el uso de la reivindicación 1, en donde el tratamiento comprende administrar las células con al menos otro tipo de célula.
- 15 **9.** Las células para el uso de la reivindicación 8, en donde el otro tipo de célula es un astrocito, oligodendrocito, neurona, progenitora neuronal, célula madre neural, célula madre epitelial de la retina, célula madre epitelial de la cornea, u otro tipo de célula madre multipotente.
- 10.** Las células para el uso de la reivindicación 8, en donde el tratamiento comprende administrar las células con al menos otro tipo de células simultáneamente con, o antes, o después de las células.
- 20 **11.** Las células para el uso de la reivindicación 1, en donde el tratamiento comprende administrar las células con al menos otro agente.
- 12.** Las células para el uso de la reivindicación 11, en donde el tratamiento comprende administrar las células con al menos otro agente simultáneamente con, o antes, o después de las células.
- 25 **13.** Las células para el uso de la reivindicación 1, en donde el tratamiento comprende administrar las células al interior de un ojo.
- 14.** Las células para el uso de la reivindicación 1, en donde el tratamiento comprende administrar las células a través de una cánula o desde un dispositivo implantado en el cuerpo del paciente dentro o en proximidad del ojo.
- 30 **15.** Las células para el uso de la reivindicación 13, en donde el tratamiento comprende administrar las células por implantación de una matriz o supercántigo que contiene las células.
- 35 **16.** El uso de las células como se expone en la reivindicación 1 en la fabricación de un medicamento para tratar una condición degenerativa ocular en un paciente.
- 17.** Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una condición degenerativa ocular, que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad efectiva para tratar la condición degenerativa ocular de células multipotentes o pluripotentes de acuerdo con la reivindicación 1.
- 40 **18.** La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 17, en donde la condición degenerativa ocular es una condición degenerativa ocular aguda.
- 45 **19.** La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 17, en donde la condición degenerativa ocular es una condición degenerativa crónica o progresiva.
- 20.** La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 19, en donde dicha condición degenerativa ocular es trauma cerebral, trauma del nervio óptico, lesión ocular, degeneración macular, retinitis pigmentosa, retinopatía diabética, glaucoma o deficiencia de células epiteliales limbares.
- 50 **21.** La composición farmacéutica para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, que comprende al menos otro tipo de célula.
- 55 **22.** La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 21, en donde el otro tipo de célula es un astrocito, oligodendrocito, neurona, progenitora neuronal, célula madre neural, célula madre epitelial de la retina, célula madre epitelial de la cornea, u otro tipo de célula madre multipotente.
- 60 **23.** La composición farmacéutica para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, que comprende al menos otro agente.
- 24.** La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 23, en donde el otro agente es un fármaco para tratar el trastorno degenerativo ocular.
- 65 **25.** La composición farmacéutica para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 17 a 24, formulada para su administración al interior de un ojo.

**26.** La composición farmacéutica para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 17 a 25, formulada como una matriz o supercántigo que contiene las células.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65