

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 770**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2006.01)

A01N 65/00 (2009.01)

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.03.2006 PCT/US2006/011573**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.10.2006 WO06105254**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2006 E 06740014 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 1864330**

54 Título: **La luz como reemplazo de factores mitogénicos en células progenitoras**

30 Prioridad:

31.03.2005 US 666582 P
29.03.2006 US 391709

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.03.2017

73 Titular/es:

**THE HENRY M. JACKSON FOUNDATION FOR
THE ADVANCEMENT OF MILITARY MEDICINE,
INC. (50.0%)
6720-A Rockledge Drive, Suite 100
Bethesda, MD 20817, US y
SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH
AND HUMAN SERVICES (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ROMANCZYK, TARA, B.;
ANDERS, JUANITA, J.;
WAYNANT, RONALD, W.;
ILEV, ILKO y
LONGO, LEONARDO**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 606 770 T3

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

DESCRIPCIÓN

La luz como reemplazo de factores mitogénicos en células progenitoras

- 5 Esta invención se hizo con la financiación del Gobierno de los Estados Unidos. El Gobierno puede tener ciertos derechos en la invención.

Campo

- 10 La presente invención se refiere en líneas generales a la diferenciación celular. Específicamente, la presente invención se refiere a métodos para promover la diferenciación o proliferación celular de células madre o de células progenitoras indiferenciadas usando un parámetro específico de la luz. Estos métodos son particularmente útiles en la regeneración celular y en el reemplazo en lesiones tisulares y en el trasplante de órganos, tejidos y células.

15 Antecedentes

- Los factores mitogénicos son una necesidad para la proliferación, migración, diferenciación, mantenimiento y supervivencia de organismos multicelulares. El destino de muchas células individuales, por ejemplo, proliferación, migración, diferenciación o interacción con otras células, se rige típicamente por la información recibida de otras células y/o por el entorno inmediato. Esta información a menudo se transmite por polipéptidos secretados, tales como factores mitogénicos.

- 20 Las células madre son células indiferenciadas con capacidad de (a) proliferación, (b) automantenimiento, (c) la producción de una gran cantidad de descendencia funcional diferenciada, (d) regeneración de tejido después de lesión y/o (e) flexibilidad en el uso de estas opciones. Las células madre son dianas importantes e ideales para terapia génica donde los genes insertados promueven la salud del individuo en que se trasplantaron las células madre. Además, las células madre pueden desempeñar papeles importantes en el trasplante de órganos o tejidos, por ejemplo, regeneración hepática e injerto de piel.

- 30 Por ejemplo, las células madre neurales (NSC) son células indiferenciadas que tienen la capacidad de auto-renovarse y diferenciarse en fenotipos neuronales y de la glía. Una preocupación principal en la investigación con células madre es determinar las condiciones óptimas para la expansión de NSC en cantidades clínicamente relevantes manteniendo al mismo tiempo el cariotipo normal y capacidades de diferenciación constantes. El concepto de diferenciación celular de células madre se muestra en la Figura 1 (Shihabuddin et al., *Mol Med Today* Vol. 5, (1999)). Actualmente, el único método para conseguir la expansión de NSC es por modificación genética para establecer una línea celular inmortalizada o por estimulación de las células con factores mitogénicos exógenos tales como factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF). No obstante, el coste de usar un factor mitogénico como agente terapéutico es caro.

- 40 La fototerapia (LT, *light therapy*), también conocida como foto-biomodulación o irradiación láser de baja potencia (LPLI, *photo-biomodulation or low power laser irradiation*), es un tratamiento no invasivo que provoca efectos biológicos mediante la absorción de luz. La LPLI ha demostrado aumentar la supervivencia y regeneración neuronal en el sistema nervioso periférico (Anders, et al., *Surg. Med.* 13:72-82 (1993), Snyder, et al, *Nwrg. Med.* 31:216-222 (2002)). La investigación ha demostrado que LT, a través de la absorción de luz por un fotorreceptor celular, en lugar de calentamiento de la célula (Anders, et al, *Surg. Med.* 13:72-82, (1993), y Mochizuki-Oda, et al., *Neurosci. Lett.* 323:207-210 (2002)), puede aumentar o disminuir la síntesis de ATP, ADN, ARN y proteínas, dependiendo de los parámetros de tratamiento aplicados (Saperia, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138:1123-1128 (1986); Greco, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163:1428-1434 (1989); Lam, et al., *Lasers Life Sci.* 1:61-77 (1986); Funk, et al., *J. Photochem. Photobiol. B:BBiol.* 16:347-355 (1992); Mochizuki-Oda, et al., *Supra* (2002)).

- 50 Mester et al. (Otolaryngology and Head and Neck Surgery, 1991, 105 (3): 449-56) describe que la irradiación láser sobre células neuroepiteliales maduras olfativas (ON) obtenidas de fetos de rata E15 y E22 induce un aumento en la excrecencia de neuritas.

- 55 La patente de Estados Unidos n.º HS6.312.451 B1 describe un método por el cual se cultivan células nerviosas embrionarias *in vitro* y se trasplantan a una región de intercambio de la médula espinal, seguido por irradiación con un aparato láser de bajo nivel.

- 60 Wollman Yoram et al. (Neurobiological Research, 1996, 18 (5): 467-70) describe que la irradiación láser de baja potencia de agregados celulares de cerebro fetal de rata de siete a nueve días de edad preparados a partir de embriones de rata induce la migración y crecimiento de las células existentes.

- Lindvall et al. (Trends in Neuroscience, 1991, 14 (8): 376-84) revisa el uso del trasplante de células para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

65

Setoguchi et al. (Experimental Neurology, 2004, 189 (1): 33-44) describe un método para el tratamiento de lesión de la médula espinal por trasplante de precursores neurales fetales modificados por ingeniería para expresar inhibidor de BMP.

- 5 Ostenfeld (Developmental Brain Research, 2002, 134 (1-2): 43-55) describe el crecimiento de células precursoras neurales aisladas de diversas regiones del cerebro de ratas y seres humanos.

10 Gasparyan et al. (Laser Florence 2004) describe la influencia de radiación láser de bajo nivel sobre la migración de células madre. En particular, Gasparyan et al., describe que la radiación láser puede aumentar la motilidad de las células madre hacia un gradiente mayor de factor-1 alfa (SDF-1) derivado de células estromáticas.

Sin embargo, la LT no se ha usado como reemplazo de factores mitogénicos para dar soporte a la capacidad de supervivencia, proliferación, diferenciación y migración celular.

15 **Sumario**

20 Un aspecto de la presente invención se refiere a un método para promover la diferenciación o proliferación celular de células madre indiferenciadas aisladas o de células progenitoras indiferenciadas aisladas, que comprende exponer las células madre o a las células progenitoras *in vitro* a una estimulación lumínica para proporcionar células estimuladas con luz, donde dicha estimulación lumínica se realiza con una luz que tiene una longitud de onda de 200-1500 nm, una densidad energética de 0,001-500 mW/cm², y una dosificación total de luz de 0,001-100 J.

25 El método es útil en una diversidad de aplicaciones clínicas. El método es útil en la regeneración celular y reemplazo en lesión tisular, tal como lesión del sistema nervioso central (SNC), lesión del sistema nervioso periférico (SNP), enfermedades neurodegenerativas y en el trasplante de órganos, tejidos y células.

30 En una realización preferida, la estimulación lumínica se realiza usando una fuente de luz que tiene una longitud de onda dentro del intervalo de 400-1200 nm, una densidad energética de 0,5-150 mW/cm² y una dosificación total de luz de 0,01-10 J.

En una realización más preferida, la estimulación lumínica se realiza usando una fuente de luz que tiene una longitud de onda de aproximadamente 810 nm, una densidad energética de aproximadamente 1 mW/cm², 50 mW/cm² o 100 mW/cm² y una dosificación total de luz de aproximadamente 0,2-10 J.

35 En otro aspecto, se describe en este documento un método para tratar una enfermedad en un mamífero o en un no mamífero usando células, tejido u órganos estimulados con luz.

40 También se describen en este documento que las células, tejidos u órganos pueden estimularse con luz *in vitro* en condiciones descritas anteriormente. Las células, tejidos u órganos tratados después se trasplantan al mamífero o al no mamífero enfermo.

También se describe en este documento que las células, tejidos u órganos pueden estimularse con luz *in vivo* en el mamífero o el no mamífero enfermo.

45 En otro aspecto, se describen células, tejidos u órganos tratados con luz. Las células, tejidos u órganos tratados con luz pueden usarse para aplicaciones tanto de investigación como clínicas.

50 Será evidente una mejor comprensión de la presente invención, sus varios aspectos y sus ventajas para los expertos en la materia a partir de la siguiente descripción detallada, tomada junto con los dibujos adjuntos, donde se muestra y describe la realización preferida de la invención, simplemente a modo de ilustración del mejor modo contemplado para realizar la invención.

Breve descripción de las figuras

55 La Figura 1 es un esquema de la diferenciación celular de células madre.

La Figura 2 ilustra el diseño experimental general para la optimización de parámetros de tratamiento lumínico.

60 Las Figuras 3A-3E ilustran el efecto de la estimulación con luz a diferentes longitudes de onda sobre el crecimiento del área superficial de NHNPC. Las Figuras 3A-3D son imágenes de NHNPC en diversas condiciones de tratamiento mostradas en las Figuras. La Figura 3E es un gráfico que resume el efecto de diversas longitudes de onda en NHNPC. Se usó un análisis de área superficial para evaluar el crecimiento de las NHNPC. Se eligieron veinte regiones aleatorias por portaobjetos por grupo a una baja energía óptica (objetivo 10x) después de la fijación para cuantificarlas. Los datos se presentan como la media ±ETM.

65

La Figura 4 muestra el efecto de la estimulación lumínica de diferentes densidades de energía sobre el crecimiento del área superficial de NHNPC. Las NHNPC se expusieron a luz de 810 nm a densidades de energía que varían de 1 mW a 100 mW una vez al día durante tres días consecutivos.

La Figura 5A-5G muestra el efecto de estimulación lumínica de diferentes dosificaciones totales de luz sobre el crecimiento del área superficial de NHNPC. Los portaobjetos tratados con luz se expusieron a luz de 810 nm a dosificaciones que varían de 0,005 J/cm² a 6 J/cm² una vez al día durante tres días consecutivos. Las Figuras 5A-5F son imágenes de NHNPC en diversas condiciones de tratamiento. La Figura 5 es un gráfico que resume el efecto de diversas dosificaciones sobre el crecimiento de NHNPC.

La Figura 6 es NHNPC sembradas en placa y cultivadas en condiciones normales (A-C) (en presencia de factores de crecimiento: FGF-2 y EGF) o que se trataron con luz de 810 nm o en ausencia de factores (D) durante 7 días. Se mezclaron y procesaron para inmunocitoquímica de un marcador usando musashi (A) y nestina (B) o inmunocitoquímica de dos marcadores usando TUJ1 y GFAP y se tiñeron con contraste con DAPI (azul) para visualizar los núcleos. Las NHNPC tratadas con factor (C) y las NHNPC tratadas con luz de 810 nm (D) marcadas con TUJ1 (rojo) y GFAP (verde). Barra = 100 µm (A, B); 200 µm (C, D).

Las Figuras 7A-7D son esquemas que muestran un diseño experimental para tratar células con luces de diferentes densidades de energía. La Figura 7A es el grupo de control, cultivado en medio convencional (medio basal de progenitores neurales (NPBM) más sulfato de gentamicina). El grupo de control no recibió factores de crecimiento, suero o tratamiento lumínico. Las NHNPC del grupo de factor (B) se cultivaron en medio convencional más EGF recombinante humano (hr) (20 ng/ml), hrFGF-2 (20 ng/ml) y un suero patentado proporcionado por la empresa, Cambrex (Walkersville, MD) llamado factor-1 de supervivencia neural (NSF-1). Las células en los grupos de luz, de 50 mW/cm² (C) y 100 mW/cm² (D) se cultivaron en medio convencional y se trataron con luz de 810 nm a una dosis de 0,2 J/cm² durante tres días consecutivos.

Las Figuras 8 A-B son gráficos de la proliferación celular de NHNPC basados en el metabolismo (A) o contenido de ADN (B).

La Figura 9A-F muestra el efecto de factores de crecimiento y tratamiento lumínico sobre la extensión de neuritas de NHNPC. Las NHNPC se sembraron en placas en cinco grupos: control negativo (A), control DCX (B), Factores (C), 50 mW/cm² (D) y 100 mW/cm² (E). Los portaobjetos tratados con luz se trataron con luz de 810 nm durante tres días consecutivos. Todos los grupos de células se cultivaron durante un total de 7 días, se fijaron, se procesaron para inmunocitoquímica DCX (rojo) y se tiñeron con contraste con DAPI (azul) para visualizar los núcleos. El portaobjetos de control negativo (A) no contenía ningún marcador para DCX. Barra = 200 µm.

La Figura 10 es un gráfico que muestra la migración de NHNPC vírgenes, definidas como NHNPC que no se expusieron a factores de crecimiento, suero o tratamiento lumínico. Estas células se privaron durante 18-24 h antes del ensayo. Después se colocaron en uno de cuatro tipos de medio atrayente durante 24 h: 1) Medio de privación: no contiene factores de crecimiento; 2) Medio de factor de crecimiento: contiene EGF y FGF-2; 3) Medio celular condicionado por luz: medio recogido de células expuestas a luz de 810 nm, 50 mW/cm² durante tres días consecutivos; o 4) Medio de privación tratado con luz: medio de privación tratado con luz de 810 nm, 50 mW/cm² durante tres días consecutivos. Los datos representados como la media ±ETM de densidades ópticas menos la densidad óptica del control blanco dividido por la media de los datos del medio de privación, se expresaron como % de control.

La Figura 11 es una composición de imágenes que muestra la inmunocitocaracterización del mitógeno FGF-2 en NHNPC. Las NHNPC se separaron en cuatro grupos: Control, factores, 50 mW/cm² y 100 mW/cm². Los portaobjetos tratados con luz se trataron con luz de 810 nm durante tres días consecutivos. Todos los grupos de células se cultivaron durante un total de 7 días, tiempo en el cual se fijaron y procesaron para inmunocitoquímica de FGF-2 (verde) y se tiñeron con contraste con DAPI (azul) para visualizar los núcleos. El grupo de control tenía un marcador FGF-2 endógeno mínimo. Barra = 100 µm (control); 200 µm (factores, 50 y 100 mW/cm²).

Las Figuras 12 A-E son una composición de la expresión de ARNm de FGF-2, EGF, BDNF, NGF y β-actina. Las NHNPC se colocaron en cuatro grupos: control, factores, 50 mW/cm² (3 días) y 50 mW/cm² (7 días). Los portaobjetos tratados con luz se trataron (luz de 810 nm, 50 mW/cm², 0,2 J/cm²) durante tres días consecutivos. Todos los grupos, con la excepción del 50 mW/cm² (3 días) se cultivaron durante un total de 7 días. Se extrajo el ARN celular total y se realizó RT-PCR. (A) Niveles de expresión de ARNm de las NHNPC en los cuatro grupos para FGF-2, EGF, BDNF y NGF. (B) Los grupos de luz 3D y 7D tuvieron expresión de FGF-2 significativamente mayor que el grupo de control (p<0,01) y de factores (p<0,01; p<0,05 respectivamente). (C) Todos los grupos expresaron ARNm de EGF. (D) Los dos grupos de luz y el grupo de factores tuvieron expresión de BDNF significativamente mayor que el grupo de control (p<0,05). (E) El grupo de luz 7D tuvo expresión de NGF significativamente mayor que los tres grupos restantes (p<0,001), aunque el grupo de luz 3D tuvo expresión de NGF significativamente mayor que el grupo de control y de factores (p<0,001).

Las Figuras 13 A-L son una composición de la expresión de proteínas de factores de crecimiento en NHNPC en tres grupos. Las NHNPC se separaron en tres grupos: control, factores y tratado con luz. Los portaobjetos tratados con luz se trataron con luz de 810 nm, 50 mW/cm², 0,2 J/cm² durante tres días consecutivos. Todos los grupos de células se cultivaron durante un total de 7 días, momento en el cual se fijaron y procesaron para inmunocitoquímica de FGF-2, EGF, BDNF y NGF (rojo) y se tiñeron con contraste con DAPI (azul) para visualizar los núcleos.

La Figura 14 es la visión global del proceso de cultivo de NHNP.

Descripción detallada

La práctica de las realizaciones descritas en detalle adicional a continuación empleará, salvo que se indique de otro modo, métodos convencionales de microbiología, biología molecular e inmunología pertenecientes a las habilidades de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía.

Un aspecto de la presente invención se refiere a un método para promover la diferenciación o proliferación celular de células madre indiferenciadas aisladas o de células progenitoras indiferenciadas aisladas, que comprende exponer las células madre o las células progenitoras *in vitro* a una estimulación lumínica para proporcionar células estimuladas por luz, donde dicha estimulación lumínica se realiza con una luz que tiene una longitud de onda de 200-1500 nm, una densidad energética de 0,001-500 mW/cm² y una dosificación total de luz de 0,001-100 J.

El tratamiento lumínico da soporte a la supervivencia, excrecencia de neuritas y migración de células no de mamífero y de mamífero, tales como células madre/progenitoras. La estimulación lumínica a longitudes de onda específicas también causa que las células madre/progenitoras neuronales se diferencien en diferentes fenotipos neuronales. El tratamiento lumínico, por lo tanto, puede usarse como reemplazo de factores de crecimiento para 1) dar soporte a la proliferación y capacidad de supervivencia celular en cultivo tisular; 2) causar la diferenciación de células madre/progenitoras en diferentes tipos celulares (por ejemplo, células estromáticas de médula ósea (BMSC) pueden generar hueso, cartílago, grasa, tendón, músculo y células neurales); y 3) causar la diferenciación de células madre/progenitoras en fenotipos celulares específicos (por ejemplo, progenitores neuronales que generan fenotipos neuronales específicos tales como neuronas glutamatérgicas, neuronas dopaminérgicas, etc.). La presente invención también puede usarse *in vitro* o *in vivo* para una diversidad de aplicaciones médicas. Por ejemplo, el tratamiento de lesiones tisulares puede emplearse en el entorno clínico en combinación con técnicas de trasplante para dar soporte al reemplazo de tipos celulares específicos en el organismo humano.

Las células madre o las células progenitoras pueden ser células madre o progenitoras aisladas, tales como células progenitoras neurales, células estromáticas de médula ósea, células madre mesenquimáticas, células madre mesenquimáticas de médula ósea, células madre mesenquimáticas placentarias, células madre mesenquimáticas derivadas de sangre periférica, células madre derivadas del bulbo olfatorio, células madre derivadas de grasa, células precursoras y madre endoteliales, células madre dérmicas de folículos capilares, células madre y progenitoras cardíacas residentes, células madre/progenitoras hepáticas fetales y células madre embrionarias no humanas.

En el entorno *in vitro*, las células se cultivan en condiciones de cultivo tisular apropiadas, que típicamente requieren un medio de cultivo diseñado especialmente, un entorno humidificado rico en CO₂ y una temperatura de incubación de aproximadamente 37 °C. Diferentes células progenitoras/madre requieren todas mitógenos o factores de crecimiento aunque pueden variar las condiciones de cultivo. Las condiciones de cultivo específicas para diversas células madre/progenitoras pueden encontrarse en Fred Gage et al., *Science* 287:1433-1438 (2000) y www.WorldHealth.net/p/1053,2161. Las células cultivadas después se siembran en placa o suspenden a la densidad apropiada y se someten a la estimulación lumínica.

La estimulación lumínica se realiza usando una fuente de luz que tiene una longitud de onda en la región ultravioleta, región visión visible o región infrarroja, a una densidad energética de 0,001-500 mW/cm² y una dosificación total de luz de 0,001-100 J.

En una realización preferida, la estimulación lumínica se realiza usando una fuente de luz que tiene una longitud de onda dentro del intervalo de 400-1200 nm, una energética de 0,5-150 mW/cm² y una dosificación total de luz de 0,01-10 J.

En una realización más preferida, la estimulación lumínica se realiza usando una fuente de luz que tiene una longitud de onda de aproximadamente 810 nm, una densidad energética de aproximadamente 1 mW/cm², 50 mW/cm² o 100 mW/cm² y una dosificación total de luz de aproximadamente 0,2-10 J.

Las células estimuladas con luz se incuban en condiciones que permiten la diferenciación y proliferación celular. Las células diferenciadas después pueden recogerse, suspenderse a una concentración apropiada y trasplantarse en un sujeto que se beneficiará de dicho trasplante celular. Los métodos y condiciones de trasplante celular se han establecido bien en la bibliografía. Se describe que las células tratadas con luz pueden ser células progenitoras neurales y el sujeto es un sujeto que tiene lesión en el sistema nervioso central (SNC) o lesión en el sistema

nervioso periférico (SNP), tal como lesión en la médula espinal, apoplejía y lesión cerebral traumática. También se describe que el sujeto puede ser un sujeto que tiene una enfermedad neurodegenerativa y otras enfermedades o afecciones. La enfermedad neurodegenerativa incluye, aunque sin limitación, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple y ALS. Otras enfermedades o afecciones que pueden beneficiarse del trasplante de células estimuladas con luz incluyen, aunque sin limitación, trasplante de hígado, diabetes y enfermedades cardíacas, tales como infarto agudo de miocardio.

También se describe en este documento que las células madre y/o progenitoras también pueden exponerse a estimulación lumínica en un entorno *in vivo*. Puede introducirse una fuente de luz en el sitio de tratamiento a través de un catéter o por un procedimiento quirúrgico. La longitud de onda, densidad energética y dosificación total de luz pueden optimizarse de acuerdo con la localización y el tipo de células que necesitan estimulación.

En otro aspecto, se describe en este documento un método para tratar una enfermedad o afección en un mamífero o un no mamífero usando tejidos u órganos estimulados con luz. Las enfermedades y afecciones que se pueden tratar con este método incluyen, aunque sin limitación, lesión del SNC y lesión del sistema SNP, tal como lesión de la médula espinal, apoplejía y lesión cerebral traumática; enfermedades neurodegenerativas, tales como enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple o ALS; diabetes y enfermedades cardíacas, tales como infarto agudo de miocardio.

Se describe en este documento que los tejidos u órganos pueden estimularse con luz *in vitro* en condiciones descritas anteriormente. Los tejidos u órganos tratados con luz después pueden trasplantarse en el mamífero o el no mamífero enfermo.

Se describe en este documento que los tejidos u órganos pueden estimularse con luz *in vivo* en el mamífero o el no mamífero enfermo.

En otro aspecto, se describen células, tejidos y órganos tratados con luz. Las células, tejidos y órganos tratados con luz pueden usarse para aplicaciones clínicas.

La ventaja de la presente invención incluye, aunque sin limitación:

Preparación celular: la luz eliminará/remplazará la necesidad de factores de crecimiento caros.

La luz a longitudes de onda específicas puede activar la producción endógena de factores de crecimiento. Esto es importante para los campos de regeneración y reemplazo celular en una lesión tisular, tales como lesiones del SNC o del SNP y otras enfermedades que se refieren a lesiones tisulares. También es importante para los campos de trasplante de órganos, tejidos y células.

Longitudes de onda específicas de luz pueden causar que células pluripotentes se vean "forzadas" a tipos específicos de células, que de nuevo sería importante para los campos de regeneración y reemplazo celular en una lesión tisular, tales como lesiones y enfermedades del SNC o del SNP y para los campos de trasplante de órganos, tejidos y células.

La presente invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos, que no deben entenderse como limitantes.

Ejemplo 1. Material y métodos

(a) Preparación de cultivo celular de NHNP

El proceso de cultivo de NHNP se muestra en la Figura 2. En líneas generales, células progenitoras neurales humanas normales (NHNPC) se les da medios con factores (FM) que contienen EGF recombinante humano (hr), hrFGF-2, y el factor-1 de supervivencia neural, o medios sin factores (M). Ambos tipos de medios contenían antibióticos. Las células se sembraron en placa a una densidad de siembra de 25.000 células/cm² en portaobjetos de 2 cámaras recubiertos con polietilenimina (PEI) o laminina.

En resumen, las células NHNP se descongelaron en un baño de agua a 37 °C durante 1-2 minutos, se resuspendieron en medio de mantenimiento de progenitores neurales (NPMM) caliente (37 °C), y se incubaron (24 horas, 37 °C, CO₂ al 5 %). El NPMM contenía sulfato de gentamicina, EGF recombinante humano (hr), hrFGF-2 y factor-1 de supervivencia neural (NSF-1). Las células se transfirieron a tubos de plástico de 50 ml y se centrifugaron (1000 rpm, 5 minutos). El sobrenadante se retiró y se resuspendió el sedimento en medio basal de progenitores neurales (NPBM) (para portaobjetos de control y tratados con luz) o NPMM (para portaobjetos de factor). El NPBM contenía todos los mismos ingredientes que NPMM excepto los factores de crecimiento y NSF-1. Las células se sembraron en portaobjetos de cámaras recubiertas con polietilenimina (PEI) o laminina a una densidad de siembra de ~25.000 células/cm². Todos los productos se adquirieron de Cambrex (Walkersville, MD).

(b) Evaluación de parámetros óptimos: Longitud de onda, densidad energética y dosificación

Las NHNPC se sembraron en portaobjetos y se trataron con luz una vez al día durante tres días y se cultivaron durante un total de siete días en tres experimentos diferentes usando las siguientes condiciones: 1) Longitudes de onda: 458,6, 477, 488,7, 515, 646, 660, 780, 807, 810, y 975 nm; 2) Dosificación (luz de 810 nm): 0,005, 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 4, y 6 J/cm²; y 3) Densidad energética (luz de 810 nm, 0,2 J/cm²): 1, 3, 10, 30, 50, y 100 mW/cm². Para cada uno de los tres experimentos, el diámetro del tamaño de mancha de láser o láseres fue 10 mm, el área fue de 0,785398 cm² y se usó un mínimo de dos portaobjetos que contenían NHNPC por grupo experimental. Adicionalmente, cada experimento tuvo dos portaobjetos de control (sin luz, sin factores de crecimiento) y de factores (factores de crecimiento solamente, sin luz). Se usó un análisis de área superficial para evaluar el crecimiento de las NHNPC después de la conclusión de cada experimento. Se eligieron veinte regiones aleatorias por portaobjetos por grupo a una baja potencia óptica (objetivo 10x) usando un microscopio Nikon (Tokio, Japón), después de la fijación para la cuantificación. Los datos se representan como la media $\pm$ ETM.

(c) Tratamiento lumínico

Las NHNPC se separaron en cuatro grupos: control (sin luz, sin factores de crecimiento), factores (factores de crecimiento solamente, sin luz), 50 mW/cm² (luz solamente, sin factores de crecimiento) y 100 mW/cm² (solamente luz sin factores de crecimiento). Todas las NHNPC tratadas con luz se expusieron a un láser de diodo de 810 nm y 150 mW a una dosis de 0,2 J/cm² cada día durante 3 días a una densidad energética de 50 mW/cm² durante 4 segundos o 100 mW/cm² durante 2 segundos.

(d) Ensayo de actividad de proliferación celular

Se determinó la proliferación celular de NHNPC usando el ensayo de proliferación celular de una solución CellTiter 96® AQueous (MTS) (Promega, Madison, WI) y el kit de ensayo de proliferación celular Cyquant (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) de acuerdo con los fabricantes. Las células usadas en los ensayos de proliferación Promega y Cyquant se cultivaron en consecuencia: las células en el grupo de medio convencional se cultivaron en medio convencional (NPBM más sulfato de gentamicina). Las células en el medio convencional + grupo de suero se cultivaron en medio convencional más NSF-1 (suero). Las células en el medio convencional + factores + grupo de suero se cultivaron en medio convencional más hrEGF (20 ng/ml), hrFGF-2 (20 ng/ml) y factor-1 de supervivencia neural. Las células en el medio convencional + grupo de luz se cultivaron en medio convencional y se trataron con luz (810 nm, 0,2 J/cm², 50 mW/cm²) durante 3 días consecutivos. Las células para los ensayos Promega y Cyquant se sembraron en placas de 24 pocillos no recubiertas a una densidad de siembra de ~25.000 células/cm².

(e) Ensayo de migración

Se usó el ensayo de migración celular colorimétrico de 24 pocillos QCM 24 (Chemicon, Temecula, CA) de acuerdo con el fabricante. Las NHNPC vírgenes se definieron como células NHNP que no se expusieron a tratamiento con factores de crecimiento, suero o luz. Estas células se privaron de suero y medio sin factores durante 18-24 horas antes del ensayo. La suspensión celular se retiró y se colocó dentro de un inserto que después se colocó en un pocillo de placa de 24 pocillos que contenía uno de cuatro tipos de medio atrayente: 1) medio de privación: no contiene factores de crecimiento o suero; 2) medio de factor de crecimiento: contiene EGF y FGF-2; 3) medio celular condicionado con luz: medio recogido de células expuestas a luz de 810 nm, 50 mW/cm², 0,2 J/cm² durante 3 días consecutivos; o 4) medio de privación tratado con luz: medio de privación tratado con luz de 810 nm, 50 mW/cm², 0,2 J/cm² durante 3 días consecutivos. Las placas después se incubaron durante 24 horas a 37 °C en una incubadora de CO₂ (CO₂ al 4-6 %). Las células/medios desde el lado superior del inserto se retiraron por pipeteo de la suspensión celular restante. El inserto de migración después se colocó en un pocillo limpio que contenía tinción celular y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente, el inserto se retiró del tinte celular y se sumergió en agua estéril varias veces para aclarar y se usó un hisopo con filtro de algodón para retirar suavemente las células no migradoras desde el interior del inserto y se dejó que seicara. El inserto teñido se transfirió a un pocillo que contenía tampón de extracción y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos y después se retiró. La mezcla de colorante se transfirió a una placa de microtitulación de 96 pocillos y se midió la densidad óptica a 560 nm.

(f) Estadísticas

El programa de software estadístico GraphPad Prism versión 3.02 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, www.graphpad.com) se usó para el análisis de datos. Las comparaciones estadísticas se realizaron usando análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) seguido por post-ensayo de Tukey para la comparación de grupos individuales. Los datos se presentan como la media $\pm$ ETM.

(g) Inmunotinción

Las NHNPC cultivadas se fijaron en paraformaldehído al 4 % (Sigma) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 10 minutos a temperatura ambiente cuatro días después del último día de tratamiento lumínico. Las células se aclararon y almacenaron en PBS. Para la inmunotinción, las células se trataron con anticuerpo primario

durante 1 hora a 4 °C para la doble cortina o durante una noche a 4 °C para todos los demás anticuerpos. Los anticuerpos primarios empleados y sus diluciones fueron las siguientes: nestina monoclonal (1:100, Chemicon, Temecula, CA); musashi policlonal (1:200, Chemicon, Temecula, CA); proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) policlonal (1:300, DAKO, Carpinteria, CA), anti- tubulina- β isotipo III (TUJ1) monoclonal (1:75, Sigma, St. Louis, MO); FGF-2 policlonal (1:100, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) y doble cortina (DCX) policlonal (1:3000, Chemicon, Temecula, CA). Para la detección de anticuerpos primarios, se usaron anticuerpos secundarios marcados con fluoresceína (FITC), o CY3 (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Los portaobjetos se montaron en vectashield con un medio de montaje DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA) para la fluorescencia y se cubrieron con cubreobjetos. No se añadió anticuerpo primario para portaobjetos de control negativo. Los portaobjetos se fotografiaron usando un microscopio fluorescente Nikon (Tokio, Japón) Labophot, y las imágenes se capturaron usando una cámara fotográfica digital fija Sony (Tokio, Japón) DKC 5000 Catseye.

(h) RT-PCR

Las NHNPC se colocaron en cuatro grupos: control, factores, luz (3 días) y luz (7 días). Los portaobjetos tratados con luz se trataron (luz de 810 nm, 50 mW/cm², 0,2 J/cm²) durante 3 días consecutivos. Todos los grupos, con la excepción del de luz (3 días) se cultivaron durante un total de 7 días. Se extrajo el ARN celular total y se transcribió de forma inversa usando perlas de síntesis de primera hebra (Marsha Pharmacia, Piscataway, NJ) según el protocolo de los fabricantes (Nitrogen, Carlsbad, CA y Amersham Pharmacia). En resumen, las células se lisaron por la adición de TRIzol. Se extrajo el ARN usando el método de cloroformo/isopropanol y se purificó con etanol al 75 % antes de resuspenderse. El ARN se transfirió a tubos que contenían perlas de síntesis de primera hebra (Amersham Pharmacia) y hexámeros aleatorios (Invitrogen) y se incubaron 1 hora a 37 °C. El ADNc resultante se amplificó usando los siguientes cebadores: FGF-2 (5'- GCC ACA TCT AAT CTC ATT TCA CA -3' (SEQ ID NO: 1); 5'- CTG GGT AAC AGC AGA TGC AA -3' (SEQ ID NO: 2)), EGF (5'- CTA ATC ACC TAC TCA ATG CCT GG -3' (SEQ ID NO: 3); 5'- TGA TTC TCC CAG TAG TCT TAC TTG G -3' (SEQ ID NO: 4)), BDNF (5'- AGC CTC CTC TTC TCT TTC TGC TGG A -3' (SEQ ID NO: 5); 5'- CTT TTG TCT ATG CCC CTG CAG CCT T -3' (SEQ ID NO: 6)), NGF (5'- CCA AGG GAG CAG CTT TCT ATC CTG G -3' (SEQ ID NO: 7); 5'- GGC AGT GTC AAG GGA ATG CTG AAG T -3' (SEQ ID NO: 8)) y β -actina (5'- GTG GCA TCC ACG AAA CTA CCT T -3' (SEQ ID NO: 9) ,5'- GGA CTC GTC ATA CTC CTG CTT G -3' (SEQ ID NO: 10)).

(i) Cuantificación de excrecencia de neuritas

Se analizaron los efectos de diferentes aplicaciones de tratamiento sobre la excrecencia de neuritas en los cuatro grupos después de inmunocitoquímica con doble cortina (DCX). DCX es una fosfoproteína que se expresa ampliamente en el SNC y está presente en neuronas jóvenes en migración y diferenciación. Los portaobjetos se analizaron usando Neuron J en Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Para cada portaobjetos, se seleccionó un mínimo de cinco neuroesferas aleatorias y se tomaron imágenes usando un microscopio fluorescente Nikon Labophot, y las imágenes se capturaron usando una cámara fotográfica digital fija Sony DKC 5000 Catseye. Todos los procesos se midieron. Los datos se presentan como la media $\pm$ ETM.

Ejemplo 2. Optimización de los parámetros de tratamiento lumínico en células NHNP

Se obtuvieron células progenitoras neurales humanas normales (NHNP) crioconservadas de Cambrex (Walkersville, MD). Los parámetros óptimos del tratamiento lumínico se identificaron a través de una serie de experimentos usando las células NHNP. Estos parámetros incluían determinar 1) la longitud de onda óptima, 2) la densidad energética óptima y 3) la dosificación óptima. Todos los portaobjetos en todos los experimentos contenían las células NHNP y se trataron con parámetros lumínicos específicos una vez al día durante tres días consecutivos. Al completarse el régimen de tratamiento, las células se fijaron en paraformaldehído al 4 % durante 10 minutos y se mantuvieron en PBS durante el procesamiento y análisis adicionales. Los portaobjetos de control no recibieron tratamiento lumínico y no contenían ningún factor de crecimiento o suero. Los portaobjetos de factor no se expusieron a tratamiento lumínico, pero contenían factores de crecimiento (factor-2 de crecimiento de fibroblastos (FGF-2) y factor de crecimiento epidérmico (EGF)) y suero. FGF-2 y EGF estimulan ambos las células y causan proliferación celular, pero ninguno es necesario para la diferenciación. Todos los demás portaobjetos fueron portaobjetos tratados con luz y no contenían factores de crecimiento.

El ensayo usado para evaluar las células NHNP en cada condición de tratamiento fue un recuento de área superficial. Usando una retícula, se evaluaron los portaobjetos al completarse el régimen de tratamiento, a aumento 10x en nuestro microscopio Nikon. El tamaño de la caja de retículo a un aumento 10x es de 1 mm². Se obtuvieron veinte mediciones de cada portaobjetos. El área superficial (mm²) cubierta por las células NHNP en la caja de retículo se midió y se realizó el análisis estadístico usando un ANOVA unidireccional y ensayo post-hoc de Tukey.

Parámetros óptimos

Se evaluaron los efectos de diversas longitudes de onda, densidades energéticas y dosificaciones sobre las NHNPC por cobertura de área superficial. En las Figuras 3A-3E, se ensayaron diez longitudes de onda de luz para

determinar la cantidad de crecimiento de área superficial soportada. Aunque el análisis estadístico usando ANOVA unidireccional con un ensayo post-hoc de Tukey comparó todos los grupos, se indican diferencias significativas para los grupos de factores y 810 nm en comparación con el grupo de control. Las células sometidas a factores o luz de 810 nm cubrían significativamente más área superficial que el grupo de control (* $p < 0,001$). Las células sometidas a luz de 515 nm cubrían significativamente menos área superficial en comparación con el grupo de factores ($p < 0,001$) y el grupo de control ($p < 0,0002$). Se determinó que las NHNPC tratadas con luz de 810 nm eran la longitud de onda óptima. En la Figura 4, las células se trataron con luz de 810 nm a densidades energéticas de 1, 3, 10, 30, 50 y 100 mW/cm². El resultado muestra que 1 (* $p < 0,01$), 50 (** $p < 0,007$), 100 mW/cm² ($p < 0,01$) y células tratadas con factores (** $p < 0,001$) cubrían significativamente más área superficial que el grupo de control. Por consiguiente, la densidad óptima de energía para las NHNPC se determinó en 1, 50 y 100 mW/cm², ya que el tratamiento lumínico a estas densidades de energía conducía a crecimiento celular comparable con el crecimiento de las células tratadas con factores. Como se muestra en las Figuras 5A-5G, no hubo significancia estadística entre los grupos de factor y 0,2 J/cm² (E,G). Tanto las NHNPC tratadas con factor como las NHNPC tratadas con 0,2 J/cm² obtuvieron significativamente más área superficial cubierta en comparación con el grupo de control (A,G) (* $p < 0,001$). Basándose en estos experimentos, se determinó que las NHNPC respondían mejor a luz de 810 nm a una dosis de J/cm² y a densidades energéticas de 1, 50 o 100 mW/cm².

Ejemplo 3. El tratamiento lumínico promueve el crecimiento neuronal

Para caracterizar las NHNPC, se examinó la expresión de nestina (verde, Figura 6A), musashi (verde, Figura 6B), TUJ1 (rojo) y GFAP (verde) (Figura 6C, D). Las células se cultivaron de acuerdo con el fabricante en presencia de factores de crecimiento y se inmunomarcaron posteriormente para los marcadores de progenitores nestina y musashi. Las NHNPC se marcaron con ambos marcadores de progenitores (Figura 6A y B), lo que demuestra la presencia de células madre/progenitoras dentro de la neuroesfera.

Para determinar si la luz dirigiría a las NHNPC a fenotipos celulares específicos que difirieran de aquellos de NHNPC cultivadas en presencia de mitógenos, se realizó inmunocitoquímica para marcadores neuronales y de la glía. Las NHNPC, cultivadas en presencia de factores de crecimiento, se marcaban para marcadores tanto neuronales como de la glía (Figura 6C). Las NHNPC, expuestas a luz de 810 nm (50 mW/cm², 0,2 J/cm²) en ausencia de factores de crecimiento, también se inmunomarcaban para TUJ1 y GFAP. En condiciones normales, los cultivos de NHNPC típicamente co-expresan GFAP y TUJ1 en cantidades equivalentes. Hubo una cantidad equivalente de marcador neuronal y de la glía encontrado tanto en el grupo de factores como en el grupo de 50 mW/cm² (Figuras 6C y D), lo que indica que la luz no cambia la morfología fenotípica de las NHNPC en estos parámetros.

Las Figuras 7A-7D son esquemas que muestran un diseño experimental para tratar células con luces de diferentes densidades de energía. La Figura 7A es el grupo de control, cultivado en medio convencional (medio basal de progenitores neurales (NPBM) más sulfato de gentamicina). El grupo de control no recibió factores de crecimiento, suero o tratamiento lumínico. Las NHNPC en el grupo de factor (B) se cultivaron en medio convencional más EGF recombinante humano (hr) (20 ng/ml), hrFGF-2 (20 ng/ml) y un suero patentado proporcionado por la empresa Cambrex (Walkersville, MD) llamado factor-1 de supervivencia neural (NSF-1). Las células en los grupos de luz, de 50 mW/cm² (C) y de 100 mW/cm² (D) se cultivaron en medios convencionales y se trataron con luz de 810 nm a una dosis de 0,2 J/cm² durante tres días consecutivos.

Ejemplo 4: Efecto de los tratamientos lumínicos sobre la proliferación, excrecencia de neuritas y migración

Se realizó el ensayo de proliferación Promega para medir la actividad metabólica de células viables basándose en la biorreducción de la sal de tetrazolio MTS en formazán, que es directamente proporcional a la cantidad de células vivas. Como se muestra en la Figura 8A, se sembraron en placa las células de cada grupo. El grupo de medio convencional + luz se trató durante tres días consecutivos, se cultivó durante cuatro días adicionales y se trató una vez a la semana hasta concluir el experimento. Las mediciones se analizaron por triplicado a 1, 2, 3 y 4 semanas. El análisis estadístico se realizó usando un ANOVA unidireccional con un ensayo post-hoc de Tukey. En las semanas 1, 2, 3 y 4, el grupo de medio convencional + luz tenía proliferación/actividad metabólica significativamente aumentada en comparación con los grupos de medio convencional + factores + suero, medio convencional y medio convencional + suero ($p < 0,001$). El grupo de medio convencional + factores + suero tenía una proliferación significativamente mayor que el grupo de medio convencional + suero ($p < 0,001$) en los cuatro puntos temporales. Los datos se presentan como la media $\pm$ ETM. Los grupos de medio convencional + factores + suero y medio convencional + suero estaban disminuidos durante las cuatro semanas en comparación con los dos grupos restantes.

Se realizó el ensayo de proliferación Cyquant para determinar la proliferación celular basándose en el contenido de ADN de la muestra. Como se muestra en la Figura 8D, las mediciones se analizaron por triplicado a 1, 2, 3 y 4 semanas. El análisis estadístico se realizó usando un ANOVA unidireccional con un ensayo post-hoc de Tukey. En las semanas 1, 2 y 3, no hubo diferencia estadística en la proliferación entre ninguno de los cuatro grupos. En la semana 4, el grupo de medio convencional + luz tenía proliferación significativamente aumentada en comparación con el grupo de medio convencional ($p < 0,01$). Los datos se presentan como la media $\pm$ ETM. El fabricante de las

células confirma que estas células tienen una tasa de proliferación muy baja a insignificante.

Para determinar si la luz influía sobre la excrecencia de neuritas de las NHNPC, se realizó inmunocitoquímica para el marcador de migración neuronal, doble cortina (Figuras 9A-E). La excrecencia de neuritas se evaluó y representó para cada grupo (Figura 9F). El portaobjetos de control negativo (Fig. 9A) no contenía ningún marcaje DCX. Las NHNPC se colocaron en tres grupos: control, factores y tratado con luz. Los grupos tratados con factores (D,F) y con luz (E,F) tuvieron excrecencia de neuritas significativamente más largas (* $p < 0,001$) en comparación con el grupo de control (C,F). Los grupos tratados con factores y con luz no eran significativamente diferentes entre sí. Barra = 200 μm . Estos resultados apoyan la hipótesis de que la luz es capaz de inducir la excrecencia de neuritas de NHNPC en ausencia de factores mitogénicos.

Para determinar el efecto de la luz sobre la migración de NHNPC, se expusieron NHNPC vírgenes a 1) medio de privación; 2) medio de factores (contenía factores de crecimiento y suero); 3) medio de privación condicionado con luz recogido de cultivos tratados durante tres días consecutivos con 810 nm, 50 mW/cm², 0,2 J/cm²; o 4) medio de privación tratado con luz (medio de privación tratado con luz de 810 nm, 50 mW/cm², 0,2 J/cm²; durante tres días consecutivos en ausencia de células) durante 24 horas adicionales y se analizaron.

Como se muestra en la Figura 10, las NHNPC vírgenes expuestas al medio de factores (** $p < 0,05$) y el medio de privación condicionado con luz (* $p < 0,01$) tuvieron un aumento significativo en la migración en comparación con el medio de privación y el medio de privación tratado con luz (ANOVA unidireccional $p = 0,002$). La migración entre los grupos de medio de factores y medio de privación condicionado con luz fue comparable. Estos datos sugieren que se secretaba uno o más factores indeterminados al medio por las células que se trataron con la luz de 810 nm, y era capaz de soportar la migración.

Ejemplo 5: El tratamiento lumínico induce la producción de mitógenos en células NHNP

Se investigó la producción de FGF-2 para determinar si había una regulación positiva o una des-regulación del factor mitogénico después del tratamiento, usando inmunocitoquímica al completarse el estudio.

Se realizó inmunocitoquímica inicial para identificar FGF-2 endógeno dentro de los grupos. Para evaluar un posible mecanismo del efecto de la luz sobre el crecimiento y la diferenciación, se realizó inmunocitoquímica inicial para determinar la producción endógena del mitógeno FGF-2. Como se muestra en la Figura 11, el grupo de factores, cultivado en presencia de los mitógenos FGF-2 y EGF, mostró una cantidad aumentada de marcador FGF-2. Los grupos tratados con luz, cultivados en ausencia de mitógenos, pero tratados con luz de 810 nm, tenían expresión aumentada de FGF-2 endógeno en comparación con el grupo de control, pero menos que el grupo de factores. El grupo de 50 mW/cm² tenía niveles comparables al grupo de factores, que se observó que eran mayores que el grupo de control y el grupo de 100 mW/cm². La presencia de FGF-2 en los grupos tratados con luz indica que la luz está actuando para inducir la producción de FGF-2 endógeno dentro de estas células, que facilita la supervivencia y proliferación.

Se realizó RT-PCR inicial para determinar si los grupos expresaban ARNm para ciertos factores de crecimiento incluyendo FGF-2, EGF, BDNF y NGF. Como se muestra en la Figura 12, las NHNPC se colocaron en cuatro grupos: control, factores, tratado con luz (3 días) y tratado con luz (7 días). Las células en el grupo de control se cultivaron en medio convencional (NPBM más sulfato de gentamicina). Las células del grupo de factor se cultivaron en medio convencional más EGF recombinante humano (hr) (20 ng/ml), hrFGF-2 (20 ng/ml) y NSF-1. Las células en los grupos de luz se cultivaron en medio convencional y se trataron con luz (810 nm, 0,2 J/cm², 50 mW/cm²) durante tres días consecutivos. Todas las células se sembraron en portaobjetos con cámara recubierta de laminina a una densidad de siembra de ~25.000 células/cm². Las células de control, factores y tratadas con luz (7 días) se recogieron 7 días *in vitro* mientras que las células tratadas con luz (3 días) se recogieron a los 3 días *in vitro*, después de lo cual se realizó RT-PCR. Se diseñaron cebadores para FGF-2, EGF, BDNF, NGF y β -actina.

La Figura 12A es la expresión génica por PCR para FGF-2, EGF, BDNF, NGF y β -actina. Las Figuras 12B-E son la medición semicuantitativa para FGF-2, EGF, BDNF y NGF. La medición de unidades arbitrarias de intensidad de cada banda se determinó usando Multi Gauge (www.lifescience.fujifilm.com), y los valores se normalizaron basándose en la muestra de β -actina. Este experimento se repitió dos veces. Los gráficos son promedios de ambas relaciones para cada factor de crecimiento. Los resultados muestran que todos los grupos expresaban ARNm de EGF (Figura 12C). Los dos grupos de luz y el grupo de factores tuvieron expresión de BDNF significativamente mayor que el grupo de control ($p < 0,05$) (Figura 12D). Como se muestra en la Figura 12E, el grupo de luz 7D tenía expresión de NGF significativamente mayor que los tres grupos restantes ($p < 0,001$), mientras que el grupo de luz 3D tenía expresión de NGF significativamente mayor que el grupo de control y de factores ($p < 0,001$).

La Tabla 1 representa un resumen de los niveles de expresión de factor de crecimiento basándose en el método semicuantitativo.

Tabla 1

Factor de crecimiento	Control	Factor	Luz 3D	Luz 7D
FGF2	-	+	++	++
EGF	++	+	+	+
BDNF	-	+	+	+
NGF	-	-	+	++

5 La expresión de proteínas de FGF-2, EGF, BDNF y NGF en NHNPC se muestra en la Figura 13. Las NHNPC se colocaron en tres grupos: control, factores y tratado con luz. Los portaobjetos tratados con luz se trataron con luz de 810 nm durante tres días. Las NHNPC de los grupos se fijaron y procesaron para inmunocitoquímica en 7 días *in vitro* (barra de escala = 200 μ m).

10 La descripción anterior es con el fin de mostrar a los expertos en la materia el modo de poner en práctica la presente invención, y no pretende detallar todas aquellas modificaciones y variaciones obvias que llegarían a ser evidentes para los expertos en la materia tras leer la descripción. Se pretende, sin embargo, que todas esas modificaciones y variaciones obvias estén incluidas dentro del alcance de la presente invención, que se define por las siguientes reivindicaciones. Las reivindicaciones pretenden cubrir los componentes y las etapas reivindicadas en cualquier

15 secuencia que sea eficaz para cumplir los objetivos pretendidos, salvo que el contexto indique específicamente lo contrario.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para promover la diferenciación o proliferación celular de células madre indiferenciadas aisladas o de células progenitoras indiferenciadas aisladas, que comprende exponer las células madre o las células progenitoras *in vitro* a una estimulación lumínica para proporcionar células estimuladas con luz, en el que dicha estimulación lumínica se realiza con una luz que tiene una longitud de onda de 200-1500 nm, una densidad energética de 0,001-500 mW/cm² y una dosificación total de luz de 0,001-100 J.
- 10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente: cultivar las células estimuladas con luz *in vitro* en una condición que permita que dichas células se diferencien o proliferen.
- 15 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha estimulación lumínica se realiza con una luz que tiene una longitud de onda de 400-1200 nm, una densidad energética de 0,5-150 mW/cm² y una dosificación total de luz de 0,01-10 J.
- 20 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha estimulación lumínica se realiza usando una fuente de luz que tiene una longitud de onda de aproximadamente 810 nm, una densidad energética de 1-100 mW/cm² y una dosificación total de luz de 0,2-10 J.
- 25 5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicha estimulación lumínica se realiza usando una fuente de luz que tiene una longitud de onda de aproximadamente 810 nm, una densidad energética de aproximadamente 1 mW/cm², 50 mW/cm² o 100 mW/cm² y una dosificación total de luz de 0,2-10 J.
6. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, en el que dichas células no se exponen a factores de crecimiento.

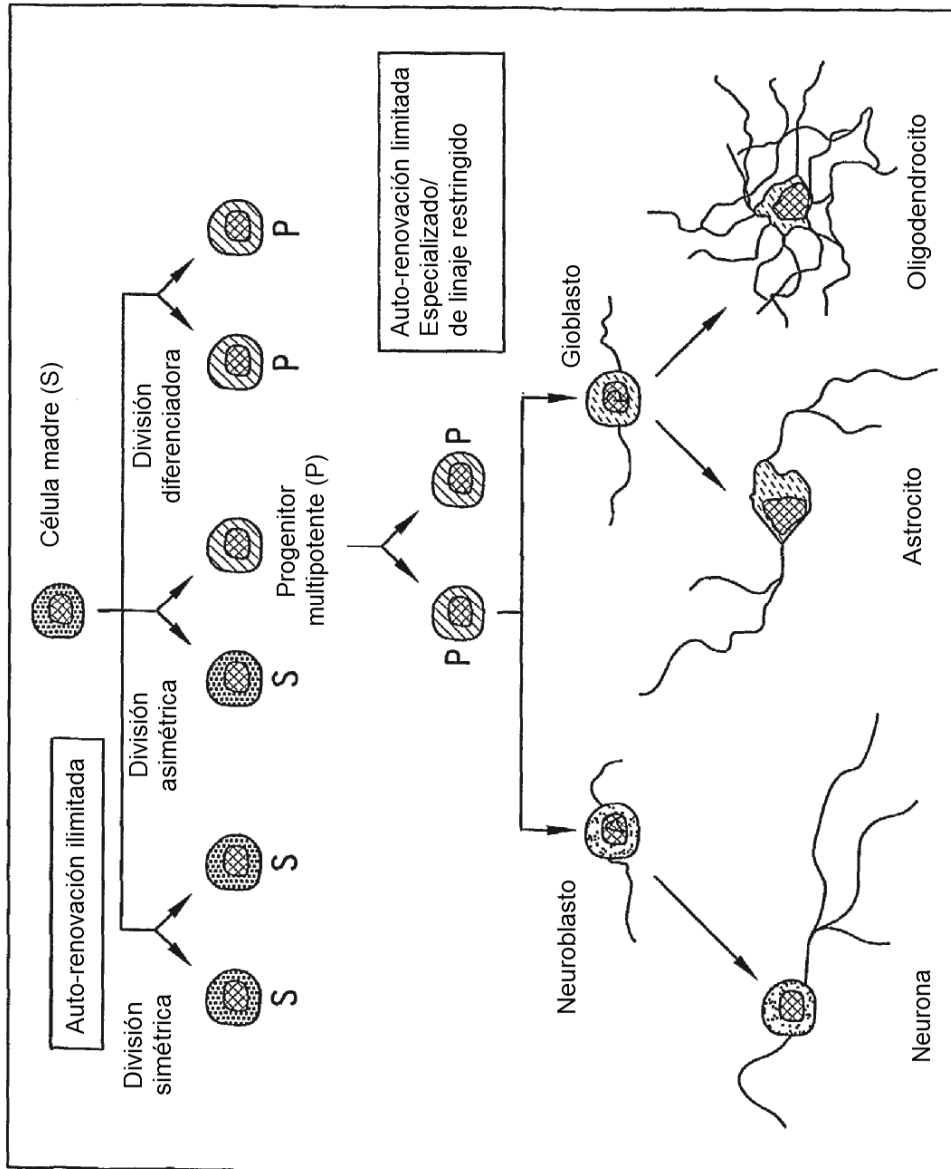


FIG.1

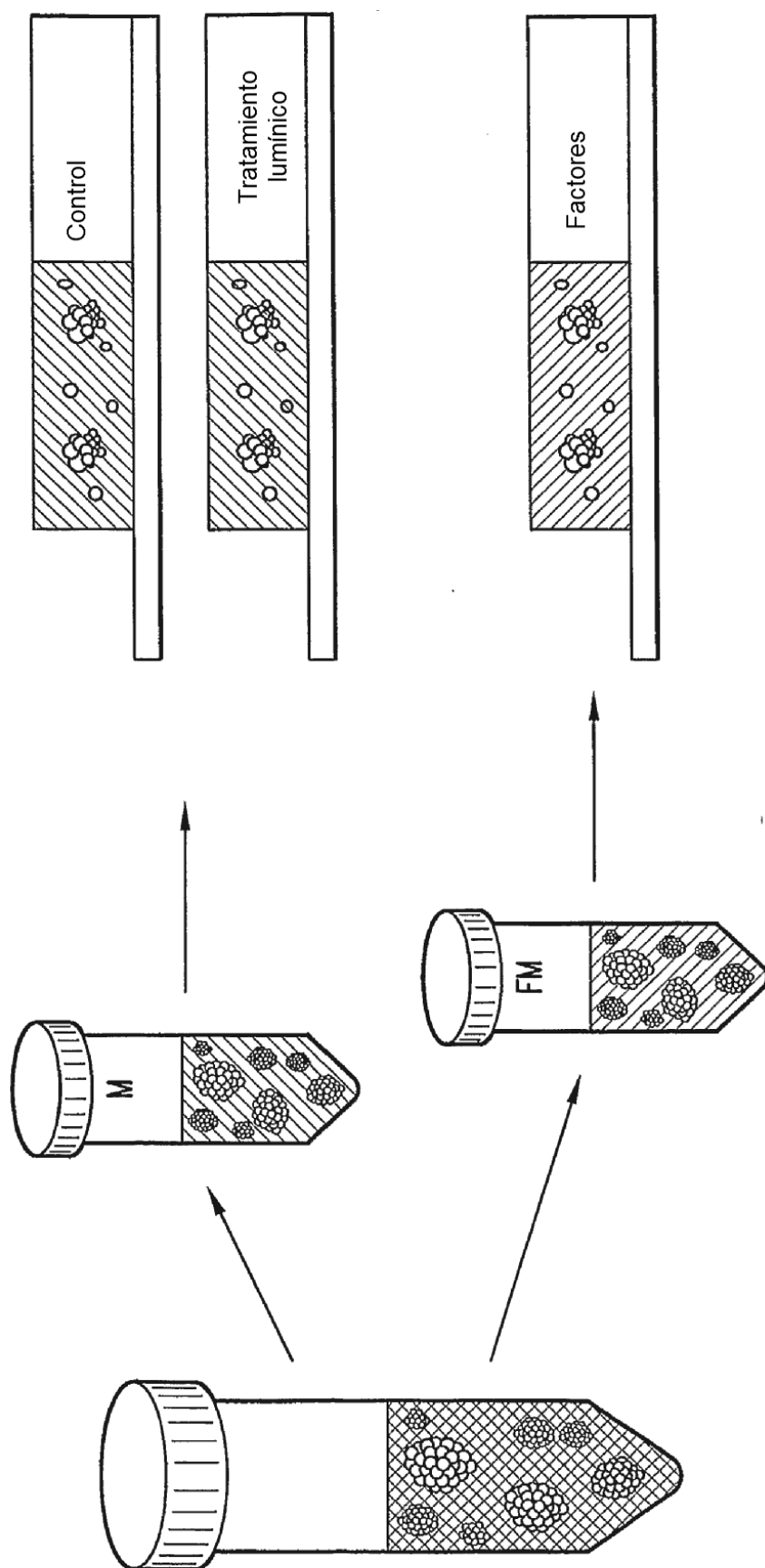
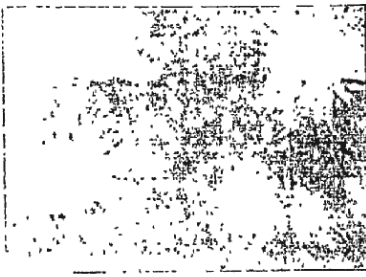
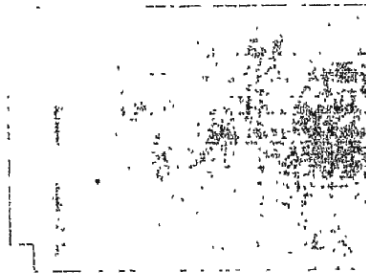


FIG.2



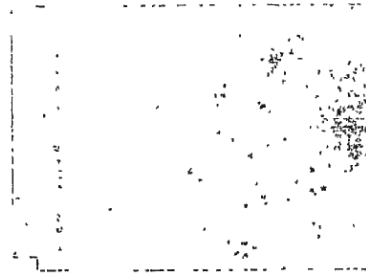
Luz de 810 nm

FIG.3D



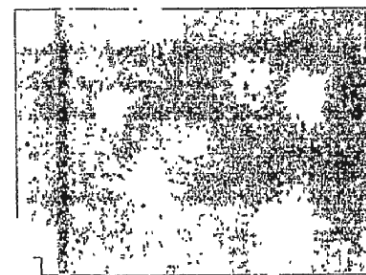
Luz de 515 nm

FIG.3C



Factores

FIG.3B



Control

FIG.3A

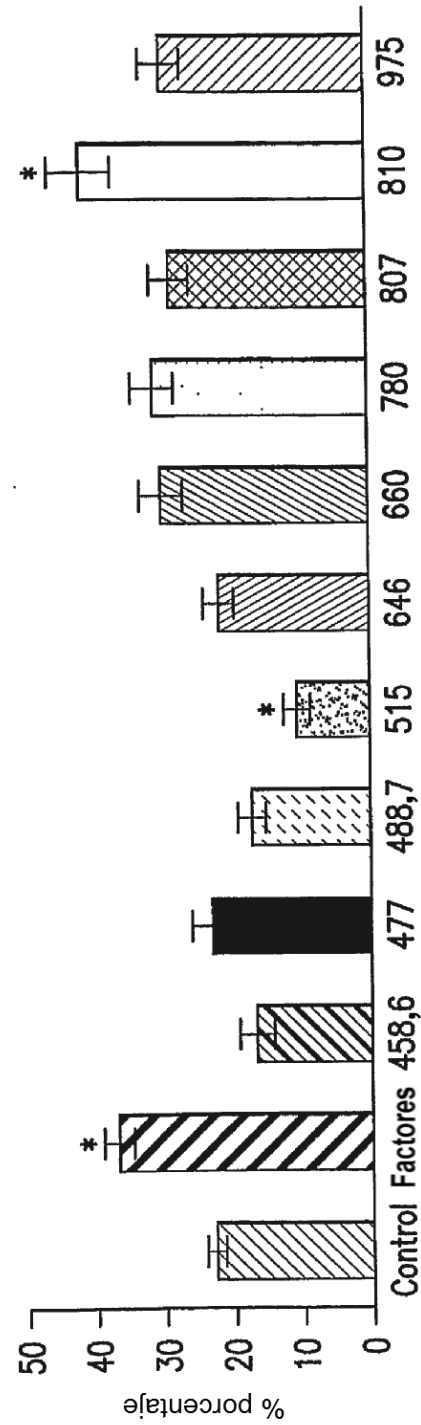


FIG.3E

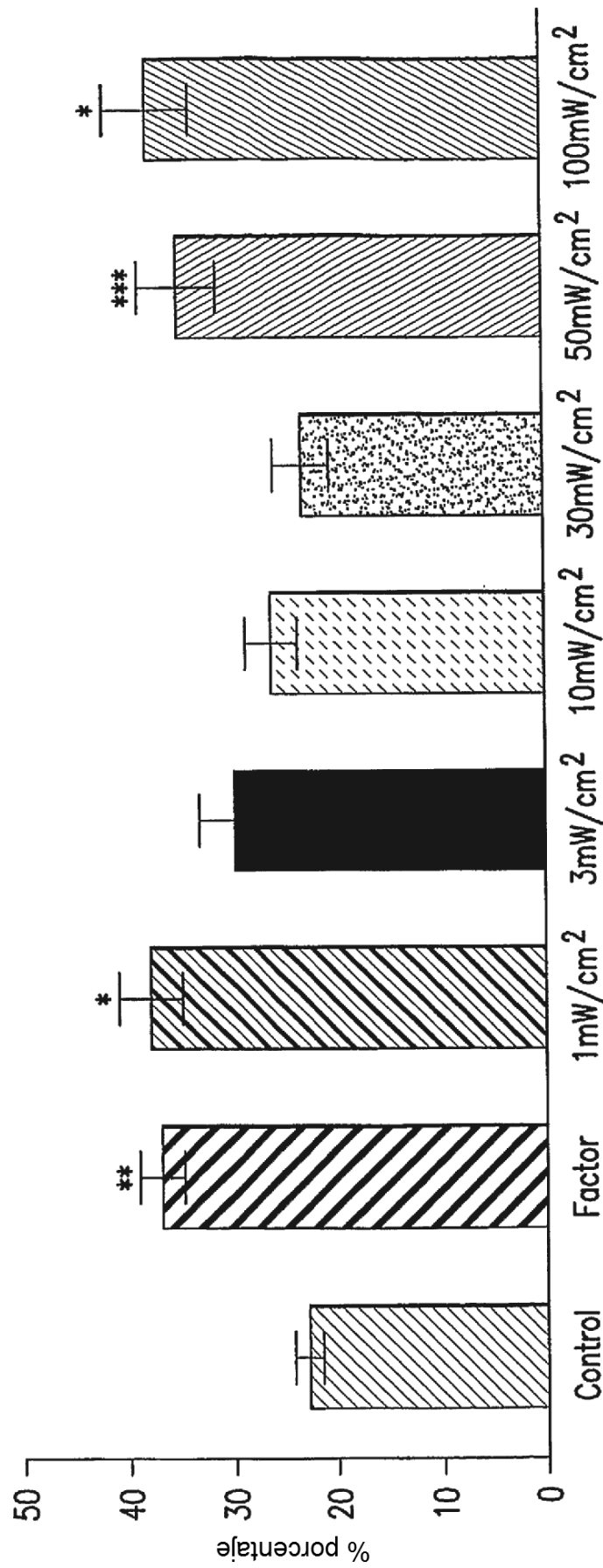
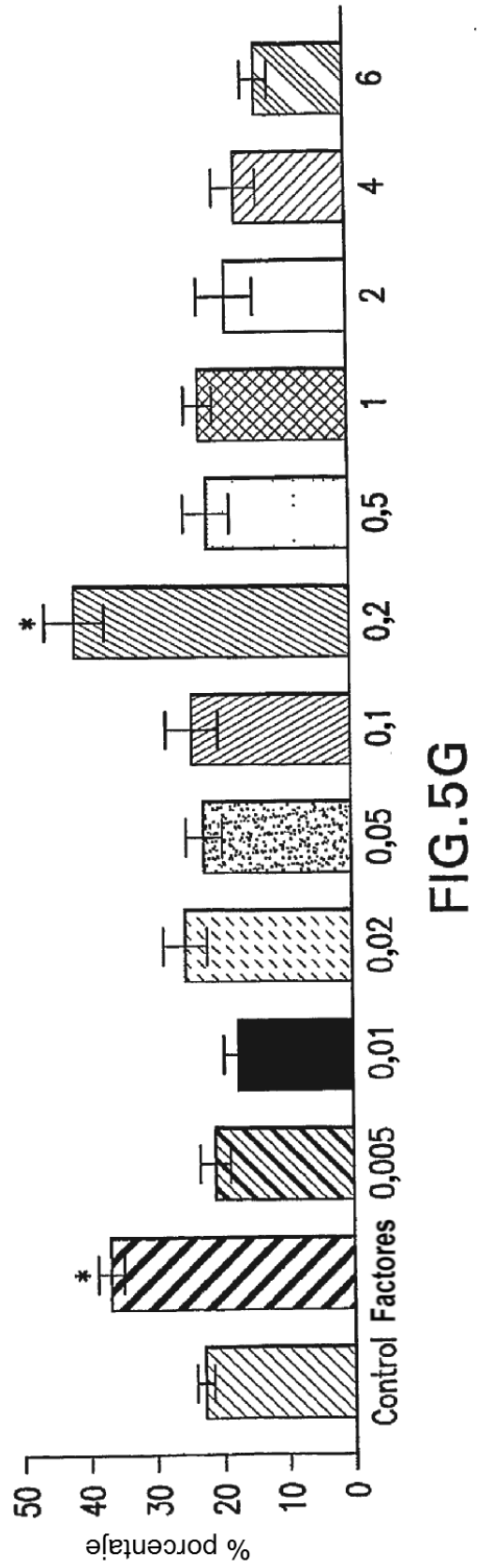
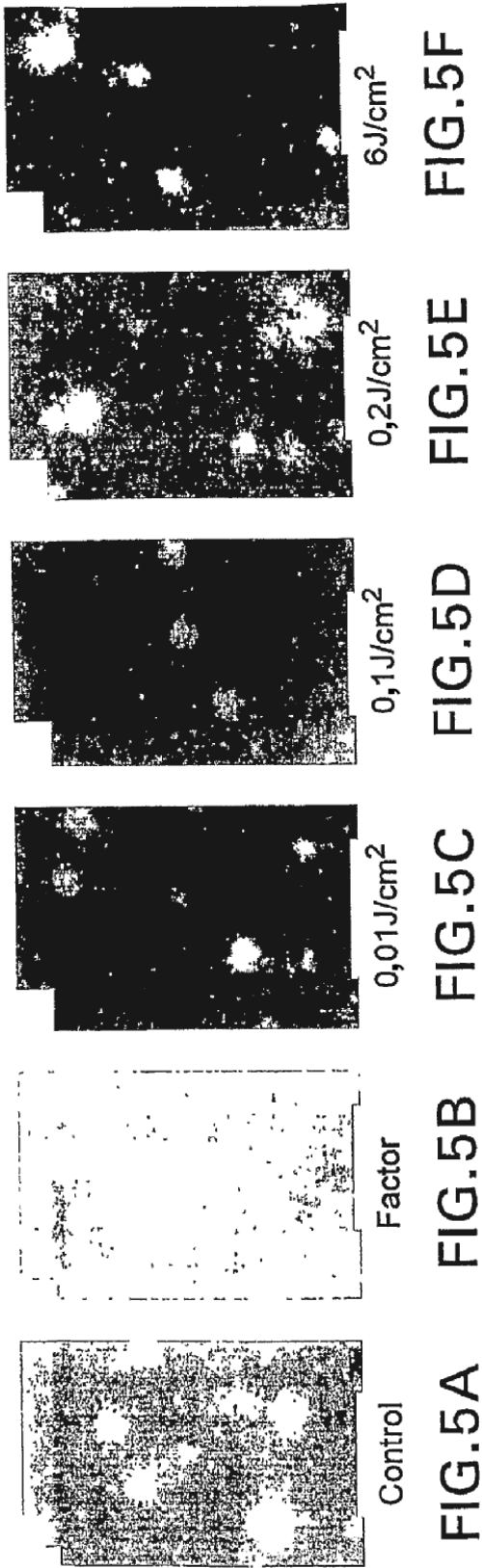


FIG.4



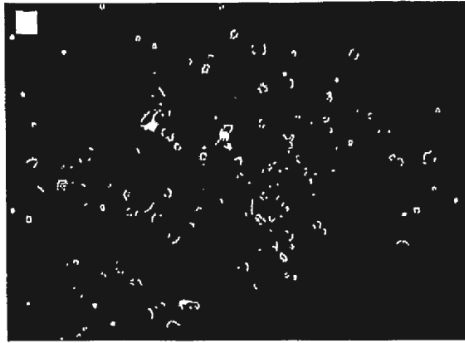


FIG. 6A



FIG. 6B

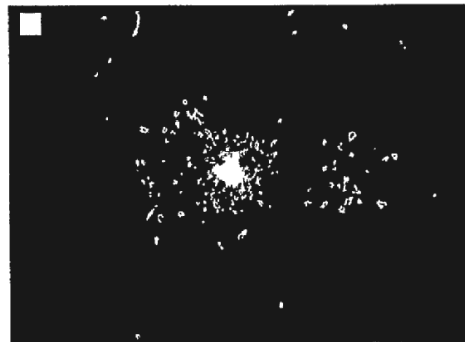


FIG. 6C

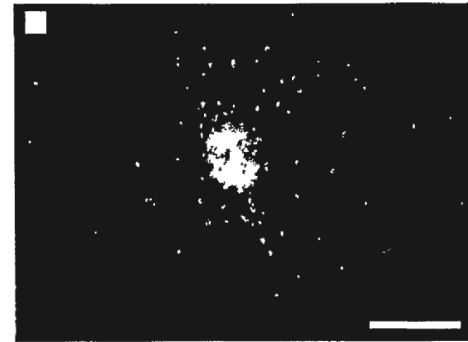


FIG. 6D

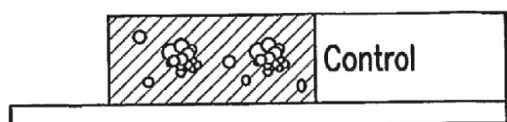


FIG.7A

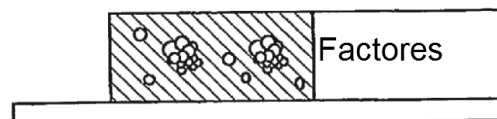


FIG.7B

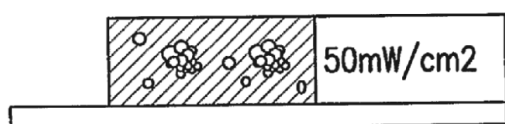


FIG.7C

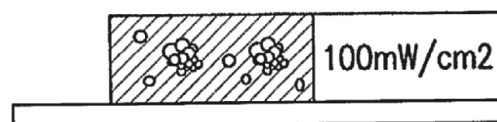


FIG.7D

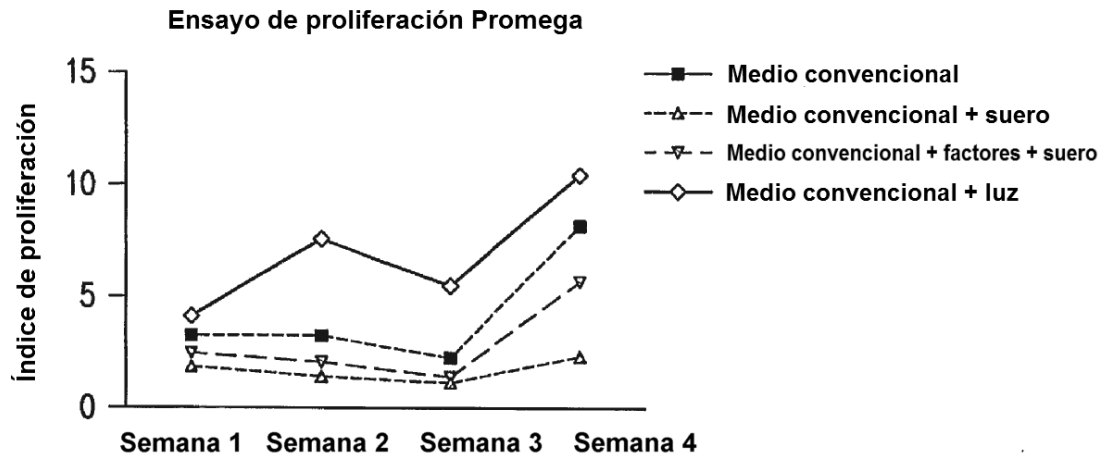


FIG.8A

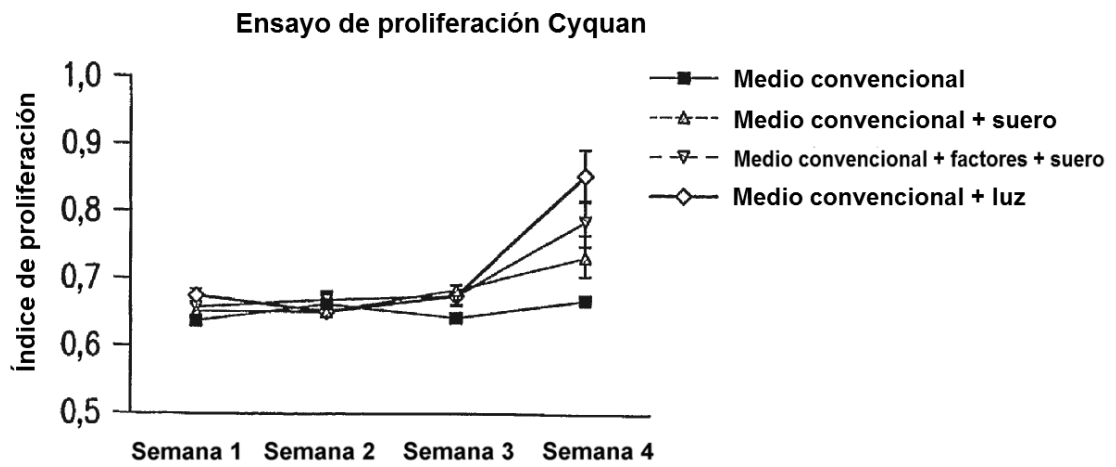


FIG.8B



FIG. 9A

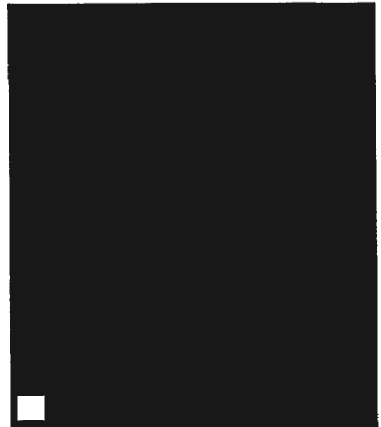


FIG. 9B



FIG. 9C



FIG. 9D



FIG. 9E

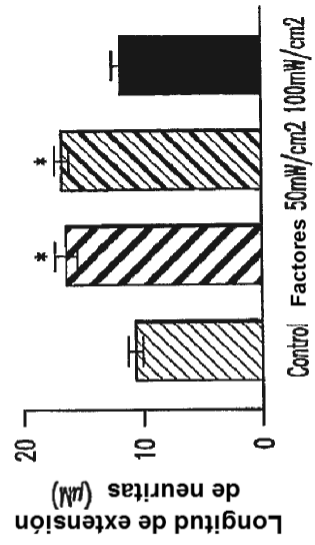


FIG. 9F

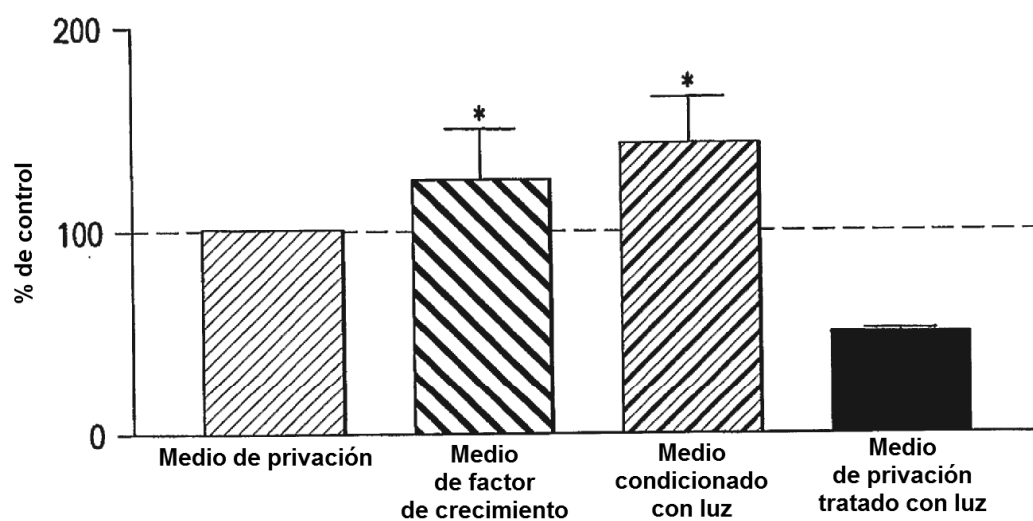


FIG.10

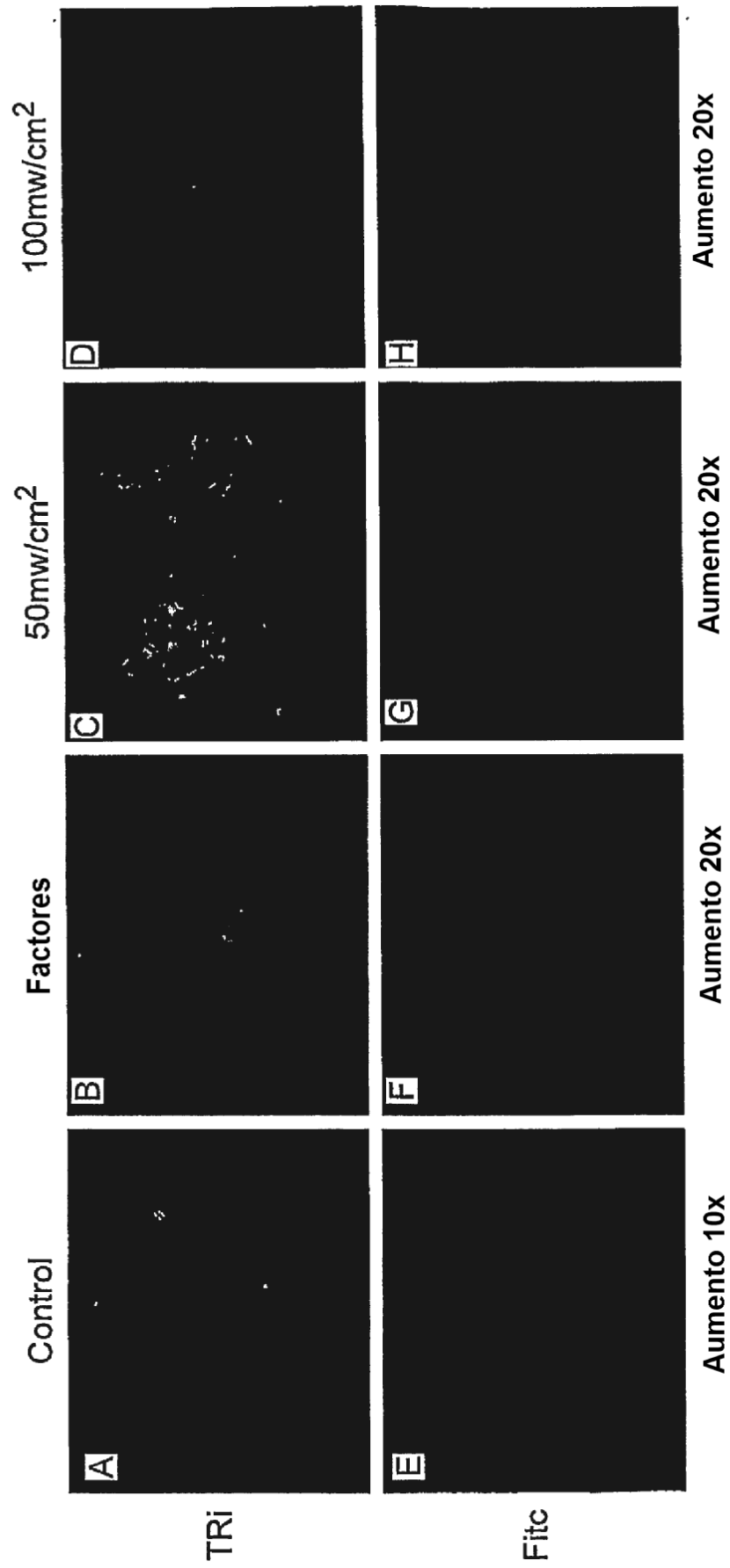


FIG.11

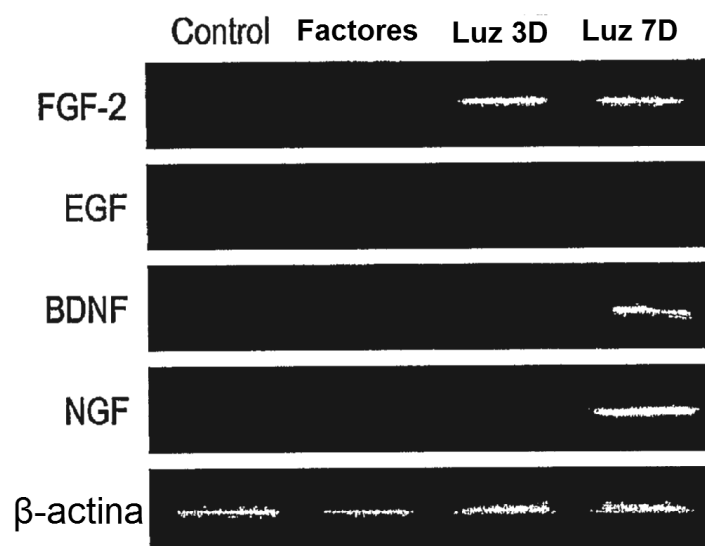


FIG.12A

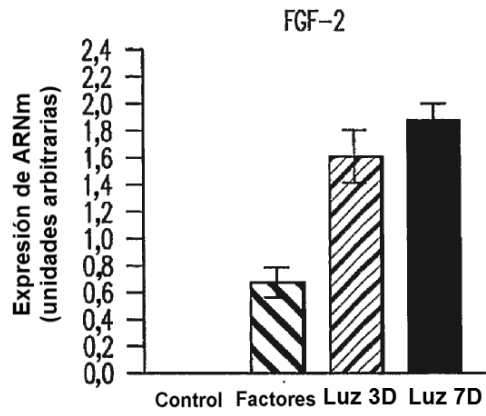


FIG.12B

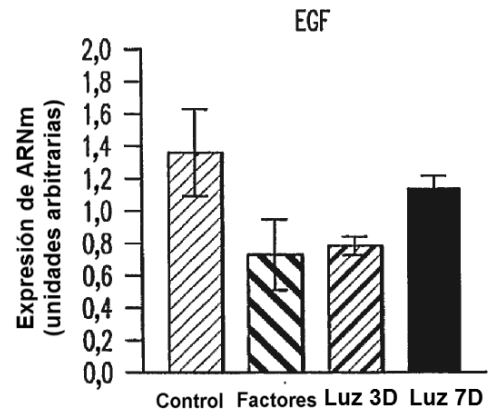


FIG.12C

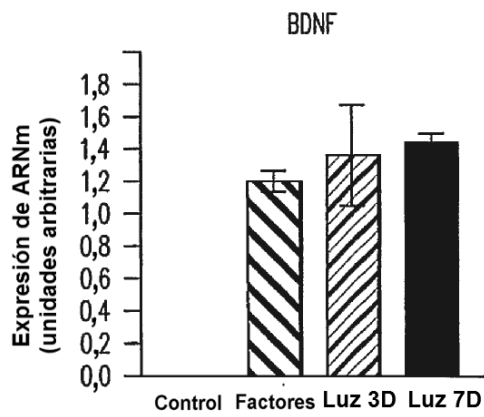


FIG.12D

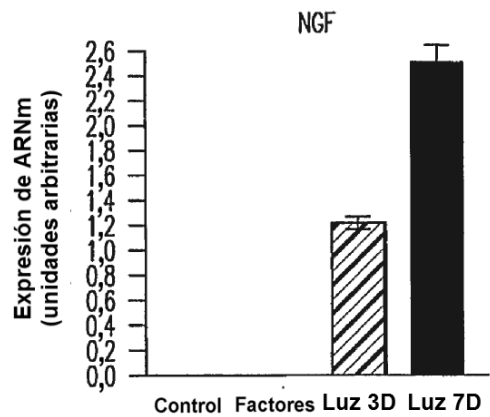


FIG.12E

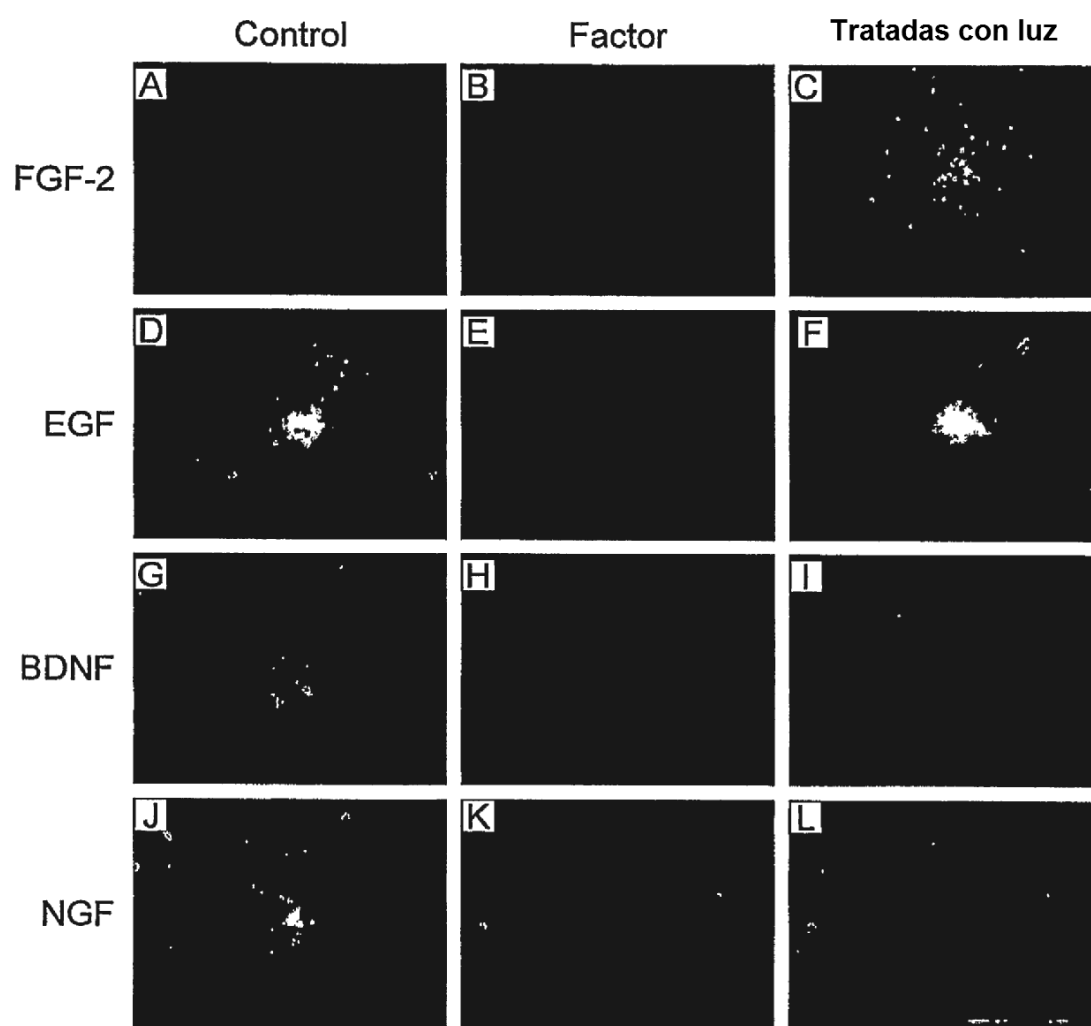


FIG.13

Resumen del proceso de cultivo de NHNP

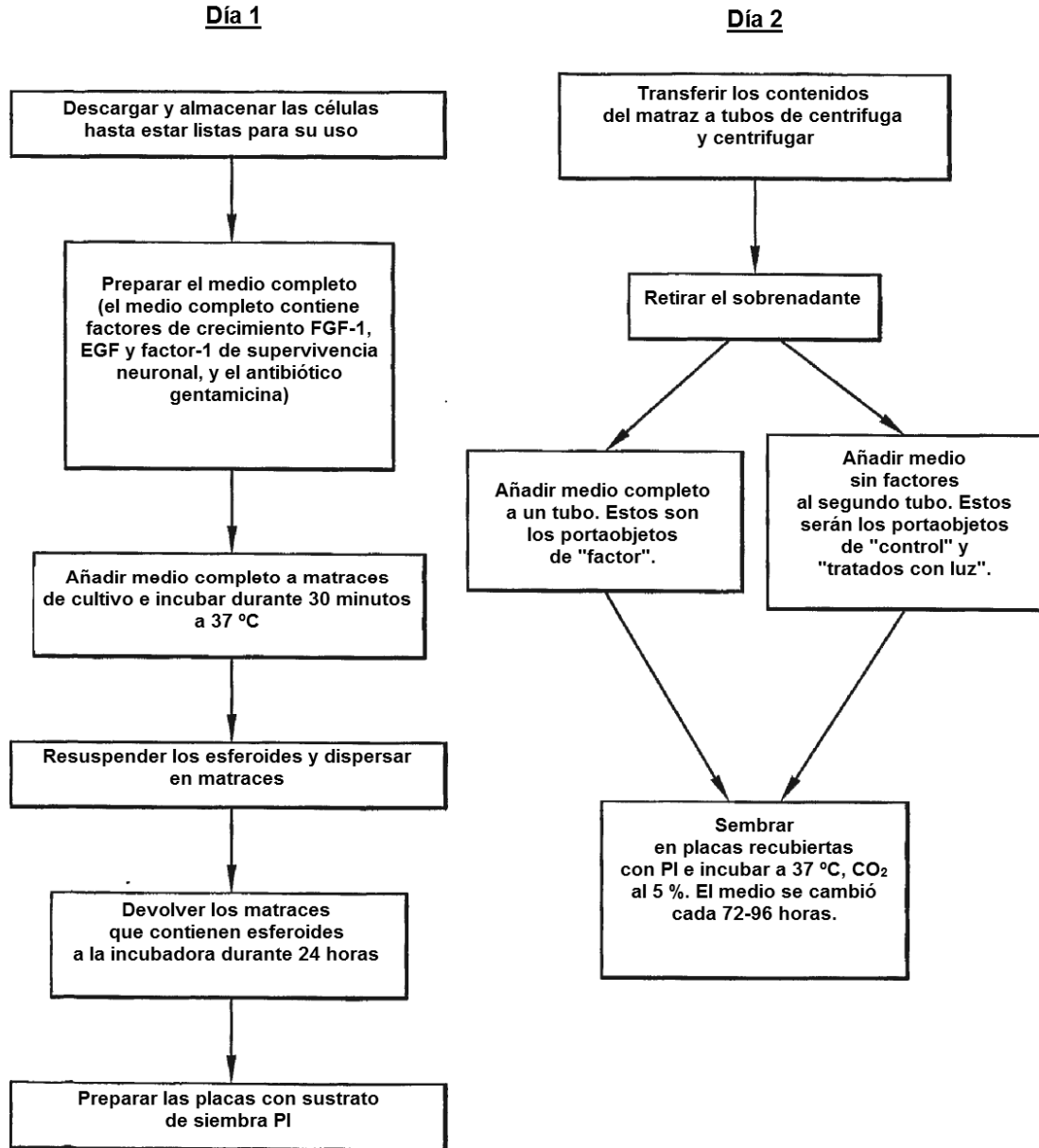


FIG.14