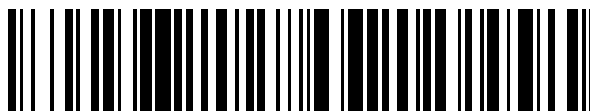


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 922**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0775 (2010.01)

C12N 5/074 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.07.2010 PCT/EP2010/060539**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.01.2011 WO11009878**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.07.2010 E 10745189 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 2456863**

54 Título: **Células madre pluripotenciales obtenidas a partir de la pulpa dental**

30 Prioridad:

21.07.2009 ES 200930488
08.10.2009 US 249846 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.05.2017

73 Titular/es:

UNIVERSITAT INTERNACIONAL DE CATALUNYA
(100.0%)
C/ Immaculada 22
08017 Barcelona, ES

72 Inventor/es:

AL-ATARI ABOU-ASI, MAHER;
CASALS FARRÉ, NÚRIA;
GINER TARRIDA, LLUÍS y
FERRÉS PADRÓ, EDUARDO

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 611 922 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

Células madre pluripotenciales obtenidas a partir de la pulpa dental

- 5 La presente invención está relacionada con células madre pluripotenciales obtenidas de la pulpa dental de pacientes de diferentes edades y su aplicación en la regeneración de tejidos.

Estado de la técnica

- 10 En los seres vivos, los tejidos sufren un desgaste a lo largo de la vida pero tienen capacidad de autorenovarse. De no existir esta renovación, se reduciría considerablemente la esperanza de vida de los seres vivos. En concreto son las células madre las que tienen esta capacidad de autorenovación de los tejidos. La capacidad de autorenovación se plasma en la capacidad de producir más células madre y, por otro lado, de generar células de uno o más tipos celulares diferenciados.
- 15 El descenso replicativo de células madre implica la degeneración y muerte de los distintos tejidos, ya sea de manera aguda (infartos) o crónica (degeneración-envejecimiento).
Por la capacidad de autorenovación citada, actualmente se aplica la terapia celular con células madre, entre otras en: patologías cardíacas, patologías de la córnea, patologías del suelo pélvico. También se tratan fístulas especialmente en enfermos de Crohn.
- 20 Las células madre se pueden clasificar según su potencial de diferenciación en: totipotenciales, pluripotenciales y multipotenciales.
Las células madre totipotentes pueden crecer y formar un organismo completo, tanto componentes embrionarios (como por ejemplo, las tres capas embrionarias, el linaje germinal y los tejidos que darán lugar al saco vitelino), como extraembrionarios (como la placenta). Es decir, pueden formar todos los tipos celulares.
- 25 Las células madre multipotentes son aquellas que sólo pueden generar células de su propia capa o linaje embrionario de origen (por ejemplo: una célula madre mesenquimal de médula ósea, al tener naturaleza mesodérmica, dará origen a células de esa capa como miocitos, adipocitos u osteocitos, entre otras).
Las células madre pluripotenciales no pueden formar un organismo completo, pero pueden diferenciarse en células provenientes de los tres linajes embrionarios: (a) ectodermo, que es el origen del sistema nervioso, el sistema respiratorio, tubo digestivo superior (estomodeo), la epidermis y sus anexos (pelo y uñas) y las glándulas mamarias; (b) endodermo, que es el origen del intestino, el hígado, el páncreas, los pulmones y la mayor parte de los órganos internos; (c) y mesodermo, que es el origen del sistema esquelético, los músculos, y los sistemas circulatorio y reproductor.
- 30 Igualmente, pueden formar cualquier otro tipo de célula proveniente del germinal y el saco vitelino.
- 35 El hecho de que las células pluripotenciales tengan la capacidad de diferenciarse en un número tan elevado de tejidos, las hace de especial interés para el diseño de nuevas terapias en general, y de terapias regenerativas en particular. Actualmente, las células madre pluripotenciales en individuos adultos se obtienen principalmente de médula ósea.
Es bien conocido en el estado de la técnica, que cuando se lleva a cabo el aislamiento y caracterización de las
- 40 células madre pluripotenciales a partir de la muestra de médula ósea extraída, existen diferentes criterios bien establecidos en el estado de la técnica que permiten clasificar de manera clara a una célula madre como célula pluripotencial.
Un primer criterio sería determinar la capacidad de diferenciación de la célula aislada a tejidos que proceden de las tres capas embrionarias (endodermo, ectodermo y mesodermo) usando medios de diferenciación disponibles
- 45 comercialmente, (cfr. Prella et al., "Establishment of pluripotent cell lines from vertebrate species, present status and future prospects", Cell Tissues Organs, 1999, vol 165, pág. 220-236).
Un segundo criterio consistiría en identificar los marcadores que expresa la célula madre aislada. Por ejemplo la expresión del gen OCT3/4 ha sido descrita como necesaria para que una célula madre sea pluripotencial (cfr. Niwa et al "Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells", Nature, 2000 vol. 24, pág. 372-376). La expresión de SSEA4 en células pluripotenciales ha sido descrita en Venable et al. "Lectin binding profiles of SSEA-4 enriched, pluripotent human embryonic stem cell surfaces" BMC Dev Biol. 2005, vol 21, pág. 5-15, y la expresión de CD13 igualmente en células pluripotentes se cita en la publicación de Young et al., "Human pluripotent and progenitor cells display cell surface cluster differentiation markers cd10, cd13, cd56, and mhc class-I", Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1999 vol. 221, nº 1, pp. 63-7).
- 50 Jiang y colaboradores (cfr. Jiang et al., "Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow", Nature, 2002, vol 418, pág. 41-47), han descrito la caracterización de células madre pluripotenciales en una población celular de la médula ósea. Esta población son las denominadas MAPC (Células progenitoras multipotenciales adultas). En este artículo se indica que las MAPCs expresan niveles altos de CD13, SSEA-4 y OCT3/4, marcadores propios de células pluripotenciales. Al igual que las células madre embrionarias, en las MAPCs se detecta la
- 60 activación de los factores de transcripción OCT-4, NANOG y REX-1, factores que son necesarios para mantener la célula en un estado proliferativo e indiferenciado. Adicionalmente, se incluyen ensayos de clonación que demuestran

que es una única célula la que es capaz de diferenciarse a tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias (endodermo, mesodermo o ectodermo).

La fuente de células madre pluripotenciales que describe este artículo es la médula ósea. En las extracciones de células madre de médula ósea es necesaria una anestesia general o local. El método que se emplea para obtenerlas es el aspirado del contenido medular mediante la punción de un hueso. El material que se obtiene pasa por una serie de procesos de cribado para separar las células. Todo esto hace que la obtención de estas células sea un proceso complejo y poco eficiente.

Por todo lo anterior existe la necesidad de encontrar fuentes alternativas a partir de las cuales se puedan extraer células madre pluripotenciales.

10

Explicación de la invención

Los investigadores de la presente invención han descubierto que la pulpa dental es una fuente de células madre pluripotenciales de aquí en adelante referidas como "DPPSCs".

15 Ventajosamente, las células de la invención están siempre presentes en los humanos, independientemente de la edad de los mismos, aunque la proporción disminuya. Tal y como se ilustra más abajo, las células madre obtenidas a partir de este tejido expresan preferiblemente los marcadores CD13, SSEA4 OCT3/4 y CD105, lo cual indica que dichas células son de tipo pluripotencial.

Además se ha comprobado que las células madre aisladas a partir de pulpa dental tienen, al ser pluripotentes, la capacidad de diferenciarse a tejidos procedentes de cada una de las tres capas embrionarias. Esto las hace de interés en el campo de la cirugía, y en particular en el campo de la reconstrucción de tejidos, tales como óseo, neuronal y hepático.

Así, la presente invención se refiere en un primer aspecto a una célula madre pluripotente caracterizada porque se obtiene a partir de la pulpa dental y expresa al menos los genes NANOG, SOX2, y expresa los marcadores SSEA4, OCT3/4 y CD105. De acuerdo con la presente invención, los términos gen y marcador referidos en la reivindicación 1 se pueden usar de manera intercambiable.

Las células de la invención tienen un tamaño pequeño entre 5 y 8 micras. Además no presentan anomalías de cromosomas o cambios estructurales durante el cultivo, elemento muy importante para su aplicación como terapia celular para la regeneración de tejidos.

30 Por otro lado, las células de la invención son células madre pluripotenciales adultas. El hecho de que sean adultas confiere las ventajas, cuando se comparan con las células madre embrionarias, de ser extraídas y administradas posteriormente al mismo individuo, minimizando así la posibilidad de rechazo.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, las células madre pluripotenciales expresan, adicionalmente, CD13, CMyc y CD90, y no expresa los marcadores CD34, CD45, CD73 y CD44.

35 Los investigadores han realizado un depósito de las células de la invención en la institución DSMZ-DeutscheSammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, con la identificación de referencia "Human dental pulp pluripotent stem cells (hDPPSC)" y con nº de acceso DSM ACC3002.

La posibilidad de extraer células madre pluripotenciales a partir de pulpa dental supone una alternativa a las fuentes de obtención conocidas hasta ahora de este tipo de células, con las siguientes ventajas: facilidad de extracción, no implica grandes riesgos frente a la intervención en médula ósea, ni costes elevados.

40 El diente está formado por dos componentes básicos: la corona y la raíz. Un diente maduro se compone de tejidos duros: esmalte, dentina y cemento, así como de un núcleo de tejido blando conocido como pulpa dental.

Los investigadores han utilizado preferentemente los terceros molares, a partir de los cuales han aislado las células que forman parte de la invención. Dado que el tercer molar es el último diente que se desarrolla en los humanos, está normalmente en una fase más temprana de desarrollo y es capaz de proporcionar una cantidad óptima de tejido de pulpa dental para el aislamiento de las células madre pluripotentes.

45 Noriaki y colaboradores, et al. "Evaluation of Pluripotency in Human Dental Pulp Cells", J. Oral Maxillofac Surg, 2009, vol. 67, pág. 501-506, indican en este artículo que aíslan células pluripotenciales de pulpa dental. Sin embargo, los datos incluidos en dicha publicación no son suficientes para que el experto en la materia pueda concluir que son pluripotentes. Al contrario, los datos y ensayos incluidos solo permiten concluir que son células multipotentes. En particular, los ensayos incluidos demuestran la capacidad diferenciadora a tejidos cuyo origen es para todos, la misma capa embrionaria, el mesodermo. Como ya se ha indicado anteriormente, existen criterios bien establecidos que permiten clasificar a una célula como pluripotencial o multipotencial. El experto en la materia, a partir de los ensayos de diferenciación realizados por Noriaki et al., únicamente podría concluir que se trata de células

50 multipotenciales, ya que comprueba la diferenciación a adipocito, condrocito y osteocito (tejidos que proceden de la misma capa embrionaria) y no aporta datos que indiquen que las células aisladas tengan la capacidad de diferenciarse a tejidos procedentes de las otras dos capas embrionarias (endodermo y ectodermo).

Por otro lado, no hay en el artículo de Noriaki y colaboradores ningún análisis de la presencia de marcadores que determinen la pluripotencialidad de la célula. Tampoco muestran otras características propias de las células pluripotenciales como su morfología, tamaño pequeño, alto potencial proliferativo, y alta clonogenicidad.

60

Los inventores de la presente invención han tenido que optimizar un medio de crecimiento adecuado para conseguir cultivar las células madre pluripotenciales presentes en la muestra de pulpa dental. Dicho medio se caracteriza por incluir los siguientes factores: LIF, EGF y PDGF. En el documento de Noriaki, se utiliza un medio de cultivo específico para el crecimiento de células multipotentes. En el Ejemplo 8 de la presente invención se muestra como no es posible el crecimiento de células pluripotenciales en un medio inadecuado, como es el medio de Noriaki para células pluripotenciales.

Por todo lo anterior, el documento de Noriaki describe el aislamiento de células madre multipotenciales. En el documento de Kerkis et al , "Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers", Cell Tissues Organs, 2006, vol 184, 105-116 se indica que se extraen células pluripotenciales de la pulpa dental. Sin embargo el origen de las células no puede ser la pulpa dental, porque los pacientes con edades de cinco a siete años no tienen pulpa dental sino lo que se conoce como germen dental, que es una agregación de células no diferenciadas que formarán el futuro diente con sus partes: esmalte, pulpa, encía, cemento, hueso, vaso sanguíneo y nervio. El origen de las células de la invención es la pulpa dental, y se pueden obtener de adultos de cualquier edad. Por otro lado, el medio que utilizan para cultivar las células es propio de células mesenquimales, y la técnica de sembraje no es la adecuada para el cultivo de células pluripotenciales.

Con un sembraje de 10.000 células por cm^2 es imposible el cultivo de células pluripotenciales para la diferenciación a fibroblastos. En la figura 1a del documento de Kerkis se muestran las células cultivadas y su morfología no es propia de células pluripotenciales, sino que es una morfología propia de células multipotenciales (cfr. Todorov et al. "Multipotent progenitor cells isolated from adult human pancreatic tissue", Transplant Proc., 2005 37(8), pág. 3420-1). El cariotipo que se muestra en la figura 1e del documento de Kerkis, se observa alterado a pesar de que se diga que es normal, porque el cromosoma 1 y 3, 4 no presentan el tamaño correcto. Esto significa que la aplicación a humanos podría generar tumores, lo cual hace desaconsejable su uso en terapia humana. Por otro lado, se observan cromosomas fragmentados, una morfología común en células tumorales; por lo tanto, su uso es desaconsejable en terapia humana.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un cultivo que comprende células madre definidas en el primer aspecto de la invención, en un medio capaz de soportar la proliferación de dichas células, dicho medio incluyendo al menos un factor de transcripción.

En el estado de la técnica son bien conocidos medios que soporten la proliferación de células madre pluripotenciales, tales como el descrito en Smith y colaboradores (cfr. Smith et al "Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides", Nature 1988, vol 336, pág. 688-690).

En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, el medio de crecimiento comprende al menos los factores de crecimiento EGF y PDGF, y el factor de transcripción LIF.

En un tercer aspecto la presente invención se refiere a un procedimiento para obtener las células definidas según el primer aspecto de la invención, que comprende los pasos de:

- a) disgregación del tejido de la pulpa dental aislada;
- b) separación de las células madre disgregado resultante de la etapa b); y
- c) cultivo de las células en un medio que tiene al menos un factor de transcripción a una concentración de sembraje entre 40-60 células/ cm^2 .

Una de las ventajas de llevar a cabo la extracción de las células de la invención de la pulpa dental, si se compara con la extracción de células madre de médula ósea, es que es más sencillo, sin que la extracción cause los problemas asociados con esta última.

Una ventaja del medio usado en el cultivo y procedimiento de la invención,, que es rico en factores de crecimiento y que incluye al menos un factor de transcripción, es que no produce alteraciones genéticas en las células, lo cual permite la aplicación de estas células en terapia celular para la regeneración de tejidos.

La disgregación tisular de la etapa (a) del procedimiento del tercer aspecto de la invención consiste en romper la malla de proteínas que forman la matriz extracelular que mantiene a las células, que forman parte del tejido, unidas. De esta manera, como consecuencia de la disgregación tisular, se acaba obteniendo una suspensión de células. Para llevar a cabo la disgregación se utilizan procesos que separan las proteínas de la matriz extracelular (por ejemplo, secuestrando los iones calcio que permiten la unión), o bien rompiendo proteolíticamente dichas proteínas (mediante la acción de proteasas), consiguiendo así una suspensión de las células presentes en el tejido. Generalmente, los métodos empleados se pueden clasificar en tres categorías:

- a) métodos mecánicos (por ejemplo cortar, picar, cribar, rascar, etc.). En cultivos celulares se emplean con frecuencia los métodos de rascado ("scrapping") de la placa para arrancar las células adheridas.
- b) métodos químicos. Generalmente se trata de la adición de soluciones en las que no hay iones divalentes o bien de agentes quelantes de estos iones. En cualquier caso se reduce las concentraciones de los iones que estabilizan las uniones de las proteínas de la matriz extracelular y de éstas con los receptores celulares.
- c) métodos enzimáticos. Tratamiento del tejido o del cultivo celular con soluciones de proteasas activas (colagenasa, dispasa, tripsina, elastasa, papaína, pronasa, hialuronidasa, etc.).

En una realización preferida del tercer aspecto de la invención, la disgregación de tejido tiene lugar mediante digestión enzimática. Más preferiblemente, la disgregación del tejido tiene lugar mediante digestión con colagenasa tipo I.

Para llevar a cabo la separación de las células del tejido disgregado (etapa (b) del procedimiento de acuerdo con el tercer aspecto de la invención), se puede usar cualquiera de las técnicas estándar bien conocidas para el experto en la materia, tales como la floculación, la flotación, la filtración y la centrifugación, entre otros. En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, la separación tiene lugar mediante centrifugación del tejido disgregado resultante de la etapa (a).

Forma parte del trabajo rutinario del experto en la materia la elección de un método u otro para llevar a cabo tanto la disgregación del tejido como la separación de las células.

Para llevar a cabo la obtención de células DPPSC del primer aspecto de la invención en el medio de cultivo de la invención, el sembraje debe ser de a una concentración baja, entre 40-60 células/cm². Los inventores de la presente invención han probado que con concentraciones mayores de sembraje las células se diferencian a fibroblastos, que se caracterizan por tener morfología fusiforme y un gran citoplasma.

Tal y como se ha indicado anteriormente, el hecho de que las células aisladas de la pulpa dental sean pluripotenciales las hace de interés en la regeneración y/o trasplante de tejidos.

Así, en un cuarto aspecto la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de células de acuerdo con el primer aspecto de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

La expresión "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad de células madre que, cuando se administra, es suficiente para regenerar o reparar un tejido. La cantidad concreta de células administrada de acuerdo con la invención será determinada por las circunstancias particulares que rodeen el caso.

En un quinto aspecto la presente invención se refiere a una célula madre pluripotente definida según el primer aspecto de la invención para su uso en la regeneración de tejido o reparación de tejido en un mamífero.

En una realización preferida del quinto aspecto de la invención, la regeneración de tejido es neuronal, de hígado o tejido óseo.

Este aspecto de la invención puede formularse como el uso de una célula pluripotente según se define en el primer aspecto de la invención para la fabricación de un medicamento dirigido a la regeneración o reparación de tejidos en un mamífero. La invención también se refiere a un método de regeneración o reparación de tejidos en mamíferos, que comprende administrar una cantidad efectiva de la célula madre según se define en la presente invención a dicho mamífero que lo necesita.

Las células de la invención se pueden usar también en la fabricación *in vitro* de tejido u órganos que en última instancia se puede trasplantar a un sujeto.

En un sexto aspecto la presente invención se refiere a una célula madre pluripotente obtenible mediante el cultivo definido en el segundo aspecto de la invención o el procedimiento definido en el tercer aspecto de la invención.

Existen numerosos protocolos en el estado de la técnica para la regeneración de tejidos en general, y de tejido óseo, hepático y neuronal en particular, a partir de las células madre pluripotentes de la invención.

Para producir células de tejido óseo, hepático y neuronal se pueden usar técnicas bien conocidas por el experto en la materia. Por ejemplo, si se desea la diferenciación a tejido óseo se podría usar cualquiera de los medios de crecimiento celular que se describen en Haynesworth y colaboradores (cfr. Haynesworth et al "Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow", Bone, 1992, vol. 13, pág. 81-88).

Para producir células de tejido hepático se podría usar el medio de crecimiento celular que se describe en Jiang y colaboradores (cfr. Jiang et al "Multipotent adult progenitor cells from human bone marrow differentiate into hepatocyte-like cells induced by co-culture with human hepatocyte line", Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2007, vol. 87, pág. 414-418).

Para producir células de tejido neuronal se podría usar el medio de crecimiento celular descrito en Jiang y colaboradores (cfr. Jiang et al "Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle and brain", Exp. Hematol., 2002, vol. 30, 896-904).

La expresión "uso de una célula pluripotencial" incluye el uso de una población de células madre, la cual se obtiene mediante el cultivo en un medio que incluye al menos un factor de transcripción. El número de células aplicado dependerá del tamaño de la lesión del tejido. La aplicación se puede llevar a cabo habitualmente mediante cirugía, de manera que las células de la invención se pueden aplicar directamente.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención. La presente invención se refiere a células madre pluripotentes. En la fecha de presentación, 21 de julio de 2010, la invención se podía llevar a cabo sin contravenir el Artículo 53(a) y la Regla 28(c).

Concretamente, la persona experta podría realizar la invención sin presuponer el uso destructivo de embriones.

Breve descripción de los dibujos

- La Fig. 1 muestra en las Fig. 1A y Fig. 1B la morfología de las células pluripotentes de la pulpa dental (DPPSC) vistas a través de un microscopio óptico con objetivos de 20 (Fig. 1A) y 40 (Fig. 1B) aumentos y células obtenidas cuando el cultivo era a alta densidad vistas con objetivos de 40 (Fig. 1C) y 100 (Fig. 1D).
- La Fig. 2 muestra una imagen por microscopio convencional (20X) donde se observa la morfología de células seleccionadas o separadas en el ejemplo 3 de la invención después de cuatro días de cultivo.
- La Fig. 3 muestra una imagen por microscopio convencional (20X) donde se observa la morfología de células aisladas mediante citómetro de flujo (cell sorter) después de cuatro días de cultivo muestra la expresión de los marcadores NANOG y SOX2 de las células DPSSC en los pases 5, 10 y 15 y la expresión de los marcadores en las células MSC de la pulpa.
- La Fig. 4 muestra una imagen por microscopio convencional (40x) donde se observa la morfología de las células de la invención diferenciadas a osteoblastos en el día 4.
- La Fig. 5 muestra la expresión de osteocalcina mediante Q-RT-PCR día 4 y día 10 respecto a los controles positivo y negativo. Los resultados se muestran en relación al control positivo (SAOS, células de osteoblastos), al que se le da un valor de 1000.
- La Fig. 6 muestra una imagen por microscopio convencional (40x) donde se observa la morfología de las células de la invención diferenciadas a neuronas en el día 4.
- La Fig. 7 muestra la expresión de nestina mediante Q-RT-PCR día 4 y día 10 respecto a los controles positivo y negativo. Los resultados se muestran en relación al control positivo (Schwann), al que se le da un valor de 1000.
- La Fig. 8 muestra una imagen por microscopio convencional (40x) donde se observa la morfología de las células de la invención diferenciadas a hepatocitos en el día 4.
- La Fig. 9 muestra la expresión de HNF3 (Factor nuclear de hepatocitos) mediante Q-RT-PCR día 4 y día 10 respecto a los controles positivo y negativo. Los resultados se muestran en relación al control positivo (Ntera), al que se le da un valor de 1000.
- La Fig. 10 muestra el estudio citogenético de las células DPPSC de la pulpa dental en el pase 15.
- La Fig. 11 muestra una imagen por microscopio convencional donde se observan los resultados del ejemplo 8. Fig 11A Medio 2. Fig 11B Medio 3.
- La Fig. 12 muestra la expresión de APHL (Fig 12A), osteonectina (Fig 12B), osteocalcina (Fig 12C) mediante Q-RT-PCR durante las tres semanas de diferenciación. Se utilizó hueso humano como control positivo, los resultados se presentan en relación a día 0 de diferenciación, que se estandariza como 1.
- La Fig. 13 muestra la expresión de HNF1b (Fig 13A), HNF6 (Fig 13B), GATA (Fig 13C). Se utilizó hígado humano como control positivo, los resultados se presentan en relación a día 0 de diferenciación, que se estandariza como 1.
- La Fig. 14 muestra la expresión de Tau (Fig 14A), Nurr1 (Fig 14B), Nestina (Fig 14C). Se utilizó cerebro humano como control positivo, los resultados se presentan en relación a día 0 de diferenciación, que se estandariza como 1.
- La Fig. 15 muestra el inmuno-fenotipo obtenido mediante análisis con FACS de población de pulpa dental fresca. La expresión de marcadores de superficie típicos SSEA4 (Fig 15A), OCT3/4 (Fig 15B) y NANOG (Fig 15C), también se muestran como una media del total de los donantes analizados (n=20) en un gráfico que muestra edad (A) versus porcentaje (P).
- La Fig. 16 muestra la expresión de los marcadores de pluripotencia NANOG, SOX2, y OCT3/4 en DPPSC a diferentes puntos de tiempo (P5 (Fig. 16A), P10 (Fig. 16B) y P15 (Fig.16C)) mediante Q-RT-PCR (El control positivo Ntera se normalizó como 100)
- La Fig. 17 muestra la comparación de expresión de los diferentes marcadores en DPPSC y DPMSC (ambas a P15) mediante Q-RT.PCR (Se utilizó como control positivo Ntera que se normalizó a 1)
- La Fig. 18 muestra el inmuno-fenotipo obtenido mediante análisis con FACS comparando DPPSC y DPMSC para STRO-1, NANOG, SSEA 4, OCT3/4 Y CD73.
- La Fig. 19 muestra la morfología celular de DPMSC (Fig. 19A) y DPMSC (Fig. 19B), ambas en el mismo pase 15 (P15).

50 Exposición detallada de modos de realización

Medios de cultivo utilizados en los diferentes ejemplos

- Medio 1. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) se utiliza para el mantenimiento y transporte de las muestras del quirófano al laboratorio.
- Medio 2. Este medio se utiliza para el cultivo de las células de la invención DPPSC (células pluripotenciales de la pulpa dental). La composición del medio es 300 ml de DMEM, 200 ml de MCDB (105 Medio SIGMA), 5 ml de SITE (insulina, transferrina, selenito de sodio, etanolamina), 1 ml de LA-BSA (ácido linoleico-albúmina de suero bovino), 5 ml de Pen/Strep, 5 ml de ácido ascórbico, 10 ml de FBS (suero bovino fetal), 500 µ l de PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas), 500 µ l de EGF (factor de crecimiento epidérmico), 50 µ

- I de LIF (factor inhibidor de leucemia), 0,4 g de BSA (albúmina de suero bovino), 5 ml de CDLC (Concentrado de lípido químicamente definido) Chemically defined Lipid concéntrate.
- Medio 3 MSC (células madre mesenquimales). Medio de cultivo de las células de control. Se utiliza para el cultivo de MSC de la médula ósea y de MSC de la pulpa dental. La composición del medio es DMEM bajo en glucosa (DMEM-LG, Gibco Brl 11885-084), 1X Pen/Strep (Cellgro 30-002-CI), 1X (0.1 mM) L-Ácido ascórbico (Sigma A- 8960), 2% FBS (Fetal bovine serum) Hyclone.
- Medio 4 Ntera. Se utiliza para el cultivo de la línea celular Ntera. La composición del medio es: DMEM alto en glucosa (DMEM-HG Gibco41966), 2% Suero de caballo (Gibco26050-070), 10% FBS (Biochrom S 0115), 10% Pen/Strep (Cellgro 30-002CI).
- Medio 5 SAOS. Se utiliza para el cultivo de las células SAOS. La composición del medio es: DMEM-HG, (Gibco41966), 2% Suero de caballo (Gibco26050-070), 10% FCS (Biochrom S 0115), 10% Pen/Strep (Cellgro 30-002CI).
- Medio 6 Schwann. Se utiliza para el cultivo de células Schwann. La composición del medio es: DMEM-LG, (Gibco 41966), 2% Suero de caballo (Gibco 26050-070), 10% FCS (Biochrom S 0115), 10% Pen/Strep (Cellgro 30-002CI).
- Medio 7. Medio de diferenciación basal. La composición del medio es: 60% DMEM-LG (GIBCO/BRL), 40% MCDB-201 (Sigma) con 1X insulina-transferrina-selenio, 1X ácido linoleico BSA (albúmina modificada con ácido linoleico), 10⁻⁹ M dexametasona (Sigma), y 10⁻⁴ M ácido ascórbico 2-fosfato (Sigma), 100 unidades de penicilina y 1.000 unidades de estreptomina (GIBCO).
- Medios 8 de diferenciación.
- A: Medio de hepatocitos: Medio de diferenciación basal con 10 ng/ml FGF-4 (R&D Systems), 10 ng/ml HGF (factor de crecimiento de hepatocitos) (R&D Systems).
- B: Medio de neuronas: los primeros 4 días se utilizó medio basal (medio 7), 100 ng/ml factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF). En el día 5 se cambió el medio por el medio basal, FGF8 (10 ng/ml), SHH (100 ng/ml). El octavo día: basal media, BDNF (Factor neurotrópico derivado del cerebro) (10 ng/ml), GDNF (Factor neurotrópico derivado de célula glial) (10 ng/ml) + N2 (R & D Systems).
- C: Medio osteogénico: DMEM-LG (GIBCO/BRL), Glutamina (100X), Pen/Strep (Cellgro 30-002CI) (100x), Antibiótico (100X), FBS 10%, 0,01 μ M 1,25 dihidroxivitamina D3 (1000X), 50 μ M ascorbato-2-fosfato (1000X), 10 μ M B-Glicerolfosfato (32,67X).

Preparación de la muestra para los diferentes ensayos

- Se seleccionaron ocho terceros molares sanos de dos pacientes diferentes, que fueron extraídos por razones de ortodoncia, profilácticas o periodontales (Ejemplos 1-8).
- Se extrajeron molares humanos sanos (3eros molares) seleccionados de 20 pacientes diferentes de diferentes edades (14-38 años) (Ejemplos 9-10).
- Inmediatamente después de la extracción de los terceros molares se procedió a realizar el lavado de los mismos utilizando una gasa mojada con etanol al 70% y posteriormente con agua destilada estéril.
- Se realizó un corte entre el esmalte y el cemento utilizando una fresa cilíndrica de turbina sujetando el diente con fórceps de incisivos superiores.
- Se realizó una fractura en la misma línea del corte mediante dos fórceps de incisivos superiores y se colocaron los dos fragmentos del diente en un frasco de Falcon con el Medio 1.
- Se trasladaron las muestras al laboratorio. Una vez en la campana de flujo, se virió el contenido en una placa de Petri.
- Se procedió a aislar los tejidos de la pulpa dental mediante una lima de tiranervios del 15 y unas pinzas de estériles. Posteriormente, utilizando una jeringa de insulina, se realizó un lavado de los conductos con DMEM y se descartaron los fragmentos dentarios.
- El siguiente paso fue realizar la disgregación celular mediante la digestión de colagenasa tipo I (3 mg/ml) del tejido de pulpa durante 40 minutos a 37°C, posteriormente se centrifugó la muestra durante diez minutos a 1.800 rpm para separar las células del tejido disgregado.
- Se realizó un lavado de las células con PBS (tampón fosfato salino) estéril y se centrifugó de nuevo durante 15 minutos a 1.800 rpm, y se determinó la viabilidad celular mediante la tinción con trypan blue. El porcentaje de la viabilidad celular era alrededor del 95%.
- Se resuspendieron las células en el medio 2. Se incubaron las células obtenidas a 37°C durante 2-3 días en frascos previamente tratados con fibronectina y se evaluó la aparición de clones o células pegadas al frasco del cultivo. Cuando se observaron suficientes células pegadas, se tripsinizaron y se expandieron manteniendo siempre una densidad baja.

Mantenimiento del cultivo celular

Las células fueron cultivadas en placas de seis pocillos tratadas con fibronectina humana al 10% en PBS (BD Bioscience) una hora antes de sembrar las células en la incubadora de CO₂. En el segundo paso, día se añadieron 2 ml de medio de cultivo, referido anteriormente como Medio 2, se añadieron y en el cuarto día se aspiraron 2 ml y se añadieron 2 ml de medio nuevo. Después de una A partir de la semana el medio 2 se cambió el medio cada tres días.

Aislamiento y cultivo de células madre mesenquimales de pulpa dental humana (DPMSC)

DPMSCs de humano adulto se aislaron de la pulpa dental del tercer molar y se suspendieron en Medio 3. Las células se sembraron a una densidad de 300000 células/cm², se cambió el medio después de 72h y cada 2 días a partir de ese momento. Para propagar las MSC, las células se despegaron cuando había un 90% de confluencia mediante la adición de tampón fosfato salino (PBS, Biochrom) con 0.005% de tripsina-ácido etilendiaminotetraacético (EDTA; Biochrom) y se resembraron a una densidad de 4000 células/cm²

Análisis por citometría de flujo (Fluorescent Activated Cell Sorting - FACS).

15 Anticuerpos utilizados para los diferentes ensayos

Para los diferentes análisis mediante citometría de flujo (FACS) fue necesario añadir a las células anticuerpos portadores de fluorocromos (Ver tabla 1).

TABLA 1

20 Anticuerpos monoclonales utilizados en el análisis por FACS

Anticuerpo	Especie	Casa comercial	Concentración
CD13 FITC	MS:MS, HUM	eBioscience	1:50
SSEA4 PE	MS:MS, HUM	eBioscience	1:50
OCT3/4 FITC	MS:MS, HUM	RD SYSTEMS	1:50
CD45 PE-Cy5	MS:MS, HUM	BDPharmingen	1:50
CD14 PE	MS:MS, HUM	BDPharmingen	1:50
CD73 PE	MS:MS, HUM	BDPharmingen	1:50
CD29 PE-Cy5	MS:MS, HUM	BDPharmingen	1:50
NANOG FITC	MS:MS, HUM	BDPharmingen	1:50
CD90 FITC	MS:MS, HUM	BDPharmingen	1:50
CD34 PE-Cy5	MS:MS, HUM	BDPharmingen	1:50
CD44	MS:MS, HUM	BDPharmingen	1:50
CD105 FITC	MS:MS, HUM	BDPharmingen	1:50
IgG1 de conejo de 595	Conejo	BDPharmingen	1:50/1:100
IgG1 de ratón de FITC	Ratón	RD SYSTEMS	1:50/1:100
IgG1 de ratón PE-Cy5	Ratón	RD SYSTEMS	1:50/1:100

MS:MS, HUM (producido en ratón, reconoce ratón y humano)

55

Como control de fluorescencia se utilizaron anticuerpos IgG1 unidos a isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), PE-Cy5 (BD Pharmingen). La suspensión celular (células resuspendidas en PBS y 2% FBS) se dividió en fracciones de 1,5 millones de células y se incubaron con los respectivos anticuerpos durante 45 minutos a 4°C y en la oscuridad. Posteriormente, las células se lavaron 2 veces con PBS y 2% FBS, y se centrifugaron 6 minutos a 1.800 rpm. Esto evitó que quedaran restos del fluorocromo, ya que darían un falso porcentaje de fluorescencia.

Dependiendo del número de células, éstas se resuspendieron entre 300-600 μ l de PBS y 2% FBS. Todas las medidas de citometría de flujo se realizaron en el citómetro FACScan y su análisis se llevó a cabo mediante el programa winMDI 2.8.

5 Análisis inmunofenotípico

Las células se fijaron mediante incubación durante 4 minutos en 4% de paraformaldehído (Sigma) seguida de una incubación durante 2 minutos a -20°C con metanol (Sigma). Para la tinción de ligandos nucleares, las células se permeabilizaron con 0.1M de Triton X-100 (Sigma) durante 10 minutos. Los portaobjetos se incubaron secuencialmente durante 30 minutos con los anticuerpos primarios, seguido de los anticuerpos IgG anti-ratón acoplados a fluoresceína, PE o Cy5. Entre cada paso, los portaobjetos se lavaron con PBS 1%BSA (Sigma). Se examinaron las células mediante microscopia confocal fluorescente (Microscopio confocal 1024, Olympus AX70, Olympus OPTICAL, Tokyo).

15 Análisis estadísticos

Los test estadísticos aplicados fueron t-test no pareados. Los datos se analizaron mediante el software SPSS Versión 12.0. Todos los valores se muestran como la media +/- la desviación estándar. La significancia estadística se fijó a $p < 0.05$.

20

Ejemplo 1. Caracterización de los cultivos celulares de la pulpa dental. Morfología celular.

Durante todo el proceso de cultivo, las células se controlaron y se observaron al microscopio para descartar la posible contaminación por levaduras, hongos o bacterias. Se intentó mantener una densidad baja teniendo en cuenta la proporción de células pequeñas (5-8 micras) respecto las grandes (10-25 micras), con el objeto de intentar aumentar el número de células pequeñas. Son estas células pequeñas las propias de la invención. En el análisis de la morfología de las células madre de la pulpa dental se realizó un seguimiento exhaustivo de los cultivos para que tuvieran capacidad adherente, hasta alcanzar el 70% de la subconfluencia de estas células. En la Fig. 1 (A y B) se observa el aspecto de la morfología de las células pluripotentes de la pulpa dental (DPPSC) vistas a través de un microscopio óptico con objetivos de 20 y 40 aumentos, respectivamente. Es importante que la densidad de siembra sea baja preferentemente entre 40-60 células por cm^2 , ya que de esta manera se asegura la obtención de las células pluripotentes. En la Figura 1 (B, C) se observa el aspecto de la morfología de las células cuando la densidad de siembra es alta 80-100 células por cm^2 . A estas densidades de siembra se observa que las células pluripotenciales se diferencian a células multipotentes, y se observan un tipo diferente de células diferentes, más grandes que las células de la invención y con morfología fusiforme.

Ejemplo 2. Análisis de fenotipo de células cultivadas en diferentes pases a partir de la pulpa dental. Análisis por citometría de flujo (FACS).

Este análisis se realizó al cabo de una, dos y tres semanas de cultivo, con el propósito de verificar que se mantiene a través del tiempo la naturaleza pluripotente de las células. En este estudio se analizó el fenotipo de células de distintos clones obtenidos a partir de una muestra de pulpa dental de un donante de 14, 17, 18, 28, 38 años de edad cultivadas a baja densidad, 840 a 10060 células por cm^2 , y expandirlas cuando el cultivo llegó a una confluencia de cultivo al 70%.

El análisis por FACS se realizó en cada semana de cultivo de las células de todos los clones (14, 17, 18, 28, 38 años) durante tres semanas de cultivo para ver el cambio de porcentaje de marcadores específicos de pluripotencialidad. Se utilizaron los anticuerpos CD13 FITC, SSEA4 PE, OCT3/4 FITC. Se analizaron más de 200.000 células por cada muestra para detectar uniones inespecíficas o autofluorescencia. No se detectaron uniones inespecíficas. También se observó una disminución de la presencia de marcadores específicos de DPPSC con el aumento de la edad, pero se veían aumentados durante el cultivo (Ver Tabla 2).

TABLA 2

Análisis por FACS para determinar el fenotipo de las células cultivadas en diferentes pases a partir de pulpa dental

	PACY	PAC 14	PAC 17	PAC 18	PAC 28	PAC 38	MEDIA	
5	CD13	Primera	16,9	15,2	20	22,1	21,7	19,18
	SSEA-4	semana	15,7	6,3	5,7	2,8	2,1	6,52
10	OCT3/4		0,9	0,7	0,2	0,08	0,08	0,392
	CD13	Segunda	18,4	30	27	52,2	48,75	35,27
	SSEA-4	semana	15,9	7,1	6,3	5,4	5,15	7,97
15	OCT3/4		1,1	0,9	0,5	0,8	0,6	0,78
	CD13	Tercera	98	30,9	38,7	54,2	51,2	54,6
	SSEA-4	semana	51,7	55,6	25,	8	10,6	30,22
20	OCT3/4		16,3	8,2	2,3	1,2	0,9	5,78

PAC Y: paciente con edad Y.

25

Se observa un aumento del porcentaje de marcadores específicos de células DPPSC, cultivadas a baja densidad celular, respecto al tiempo de cultivo. También se observa una disminución de la presencia de marcadores específicos de DPPSC con el aumento de la edad aunque, como se ha indicado anteriormente, Se puede concluir que a través del tiempo, mantienen su naturaleza pluripotente, y, por tanto, podrían ser interesantes para terapias de regeneración, reparación o trasplante de tejidos. se vea aumentado el porcentaje de marcadores durante el tiempo de cultivo.

30

Se realizó también un análisis adicional por FACS utilizando la muestra del donante de 14 años en la tercera semana de cultivo. Además de los anticuerpos CD13, SSEA4, OCT3/4, se utilizaron los marcadores CD45, CD73, CD105, CD34. La tabla 3 muestra los resultados.

35

TABLA 3

Fenotipo de las DPPSC de muestra paciente 14 años

40

Muestra 14 años	
CD105	93,3%
CD45	0%
CD73	0%
CD14	8%
CD44	0%
CD90	42%
CD13	98%
SSEA4	51%
OCT3/4	16%
CD34	0%

45

50

55

Según se desprende de la tabla 3 las células DPPSC de la invención expresan los marcadores CD105, CD14, CD90, CD13, SSEA4, OCT3/4 y no expresan los marcadores CD45, CD73, CD44 y CD34, por ser la mayoría marcadores de células pluripotenciales, de esta manera, queda demostrado la pluripotencialidad de las células de la invención mismas.

60

Ejemplo 3. Análisis de fenotipo de células positivas al SSEA4 separadas por el citómetro de flujo (cell sorter)

Se extrajo una muestra de pulpa dental de un paciente de 18 años. Seguidamente, se aislaron por FACS las poblaciones positivas al CD13 FITC (eBioscience) y SSEA4 PE (eBioscience), y se aisló también la población doble 5 positivas al CD13 y SSEA4. Se recogieron las células en placas de cultivos de 24 pocillos. La separación por FACS se realizó en un Coulter, EPICS ELITE-ESP®.

Se realizó la separación, mediante citometría de flujo, de la población de células SSEA4 positivas (SSEA4+) 10 contenidas en la muestra original de la pulpa dental obtenida el mismo día de la extracción. De estas células se estudió su fenotipo y se comparó con el de las células DPPSC cultivadas pero no seleccionadas por citometría de flujo.

La citada separación o el aislamiento se realizó en un citómetro de flujo con un dispositivo separador de células, EPICS ELITE-ESP®.

Se consiguieron separar 250 células positivas a SSEA4 (SSEA4+), se cultivaron estas células en una placa de 90 15 pocillos tratadas con fibronectina humana (BD Bioscience) una hora antes de sembrar las células en la incubadora a 37°C y 5% de CO₂. En cada pocillo se sembraron 10 células con 150 µl de Medio 2.

Las células así separadas sobrevivieron al proceso y fueron proliferando hasta obtener los pocillos subconfluentes. También presentaban una morfología muy similar a las DPPSC de la pulpa dental no separadas por citometría (ver Fig. 2). También se determinó el fenotipo de estas células mediante marcadores siendo similar a las células de la pulpa dental no separadas por citometría (ejemplo 2). Ver tabla 4.

20

TABLA 4

Análisis fenotipo por FACS de las células positivas a SSEA4 aisladas por el citómetro (cell sorter)

CD105	CD45	CD13	SSEA4	OCT3/4	CD34
95%	0%	95%	51%	12%	0%

25

De esta tabla se desprende que el proceso de aislamiento celular mediante citómetro (cell -sorter) no mejora la pureza o homogeneidad de las DPPSC obtenidas mediante el cultivo in vitro durante distintos pases.

30 Ejemplo 4. Análisis de la expresión de marcadores NANOG, SOX2, de pluripotencialidad en células DPPSC de la pulpa dental mediante Q-RT-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa por transcripción reversa y cuantitativa)

Para determinar la expresión de genes mediante Q-RT-PCR se utilizó el sistema Syber-Green. En este sistema la reacción se llevó a cabo en un volumen de 22 µl totales: 20 µl de mezcla (Syber-Green subermix) y 2 µl de muestra de ADN complementario (cDNACdna). Las muestras se sometieron a 40 ciclos tras un ciclo de 35 desnaturalización de 2 minutos a 50°C. Se utilizaron en todos los casos un control positivo y negativo para cada muestra, así como un control de carga GAPDH (Gliceraldehído-fosfato-deshidrogenasa).

Mediante Q-RT-PCR se demostró la expresión NANOG, SOX-2, en las células DPPSC de la pulpa dental del clon del paciente con 14 años, y se realizó la comparación de expresión de estos genes en fase 5, 10, 15, utilizando la células NTERA como control positivo y MSC de la pulpa como control negativo.

40 Se observó que la expresión del NANOG y SOX-2 aumentaba entre los pases 5, 10 y el pase 15. Ver Fig. 3. La expresión de estos genes es esencial para promover la proliferación de estas células sin su diferenciación, manteniendo su capacidad de renovación, como las células madre embrionarias.

Anteriormente se realizó la eficiencia de amplificación de cada gen en las células NTERA en diferentes concentraciones (1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001) del cDNA. Se observó que la amplificación del cDNA resulta lineal 45 entre 19.98 a 28.46 ciclos para GAPDH, entre 24.15 a 30.73 ciclos para NANOG, y entre 25.30 a 31.27 ciclos para SOX-2. Las pendientes de amplificación de los genes fueron: GAPDH $y = 3,0196x + 14,412$, $R^2 = 0,97$. NANOG $y = 3,2878x + 20,841$, $R^2 = 0,9999$. Sox2 $y = 2,9832x + 22,563$, $R^2 = 0,9802$.

Las secuencias de los cebadores y sondas utilizadas se describen a continuación:

50 Detección de GADPH por Syber-Green:

Cebador directo (SEC ID NO 1): 5'TGGTATCGTGGAAGGACTCATGAC3'

Cebador reverso (SEC ID NO 2): 5'ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC3'

Detección SOX-2 sistema Syber-Green:

55 Cebador directo (SEC ID NO 3): 5'GGGAAATGGGAGGGGTGCAAAGAGG3'

Cebador reverso (SEC ID NO 4): 5'TTGCGTGAGTGTGGATGGGATTGGTG3'

Detección NANOG sistema Syber-Green:

Cebador directo (SEC ID NO 5): 5'AAAGAATCTTCACCTATGCC3'
 Cebador reverso (SEC ID NO 6): 5'GAAGGAAGAGGAGAGACAGT3'

Ejemplo 5. Diferenciación de células de la pulpa dental

5

Con el objetivo de determinar la pluripotencialidad de las DPPSC de la pulpa dental analizamos el potencial de diferenciación in vitro hacia tejidos de cada una de las tres capas embrionarias, mesodermo, endodermo y ectodermo.

10 Diferenciación mesodérmica. Diferenciación a osteoblastos

Se sembraron las células a diferenciar en placas de 24 pocillos en el medio de cultivo a una densidad de 3 x 10³ células por cm² en medio basal. Al día siguiente se cambió el medio de cultivo por medio de diferenciación referido en esta patente como C: medio osteogénico, en la sección "medios de cultivo usados en los diferentes ejemplos" DMEM-LG, 10% FBS, 10 mM β-glicerolfosfato (Sigma), 50 μM de ácido L-ascórbico (Sigma), 0,01 μM 1,25 dexametaso- na y 1% penicilina y streptomicina.. Se cambió el medio cada 3 días durante 10 días. Mediante técnicas de Q-RT-PCR se demostró que estas células se habían diferenciado a tejido óseo, expresando genes específicos de este tejido, como osteocalcina. Para determinar la presencia de osteocalcina en Q-RT-PCR se utilizó como cebador directo la secuencia (SEC ID NO 7) 5'GGTGCAGAGTCCAGCAAAGG3' y como cebador reverso la secuencia (SEC ID NO 8) 5'AGCGCCTGGGTCTTCTCA3'.

Se utilizaron células de SAOS (cedidas por el Dr. Miguel Barajas de la Universidad de Navarra) como control positivo y células DPPSC de pulpa dental indiferenciadas como control negativo y GAPDH como gen constitutivo (HK). Como se observa en la Fig. 54 la concentración de osteocalcina se ve aumentada en el día 4 respecto al día 0.

En la Fig. 45 se observa también la diferenciación a osteoblastos por microscopio convencional, mostrando las células la morfología propia de dicho tipo celular.

El mismo ensayo se llevó a cabo, pero extendiendo el periodo a 21 días. El medio se cambió cada tres días como se hizo en el caso anterior. La expresión de osteocalcina (Fig. 12C) osteonectina (Fig. 12B) y APL (Fig. 12A) como genes específicos de tejido óseo, y NANOG se determinaron cada semana. La concentración de osteocalcina, osteonectina y APL aumentan a lo largo de las semanas, demostrando la diferenciación mesodérmica. También se analizó la desaparición de la expresión del gen NANOG a lo largo de las tres semanas de diferenciación. cDNA de hueso humano (Ambion) se utilizó como control positivo y GAPDH como control de carga (HK).

Los cebadores utilizados para la amplificación fueron los siguientes: para APL, (SEQ ID NO 13) 5'GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA3' como cebador directo y (SEQ ID NO 14) 5'TGGACTCCACGACGTACTCA3' como cebador reverso, para osteocalcina se utilizaron los cebadores del caso anterior, (SEQ ID NO 7) y (SEQ ID NO 8), y para osteonectina (SEQ ID NO 15) 5'AGGTATCTGTGGGAGCTAATC3' como cebador directo y (SEQ ID NO 16) 5'ATTGCTGCACACCTTCTC3' como cebador reverso. Para NANOG el cebador directo fue (SEQ ID NO 5) y el cebador reverso (SEQ ID NO 6).

La RT-PCR se realizó en CFX96 (Bio-Rad), usando 50 ng de cDNA y SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories) El cDNA de las muestras se amplificó mediante cebadores específicos en las siguientes condiciones, 50°C 2 minutos, 95°C 10 minutos, 95°C 0,15 minutos, 60°C 1 minuto (40 ciclos), 72°C 1 minuto, curva de desnaturalización desde 65°C hasta 95°C.

Los resultados indican que las células DPPSC se pueden diferenciar a tejido óseo ya que expresan los genes específicos de dicho tejido.

45 Diferenciación ectodérmica. Diferenciación a neuronas

Se sembraron las células a diferenciar en placas de 24 pocillos en el medio de cultivo a una densidad de 25-30 células por cm² en medio basal. Al día siguiente se cambió el medio de cultivo por medio de diferenciación, referido en la presente solicitud como B: Medio de neuronas, en la sección "medios de cultivo usados en los diferentes ejemplos"; en los primeros 4 días medio basal 100 ng/ml (bFGF); el octavo día, medio basal m, FGF8 (10 ng/ml), SHH (100 ng/ml), BDNF (10 ng/ml), GDNF (10 ng/ml) + N2 (R&D Systems). Se cambió el medio cada 3 días durante 10 días. . En la Q-RT-PCR se utilizaron células de Schwann (cedidas por el Dr. Miguel Barajas de la Universidad de Navarra) como control positivo y GAPDH como control de carga (HK). Como se observa en la Fig. 76 la concentración de NESTINA aumentó en el día 4 respecto al día 0.

Para determinar la NESTINA en Q-RT-PCR se utilizó como cebador directo la secuencia (SEC ID NO 9) CAGGA GAAACAGGGCCTACA y como cebador reverso la secuencia (SEC ID NO 10) TGGGAGCAAAGATCCAAGAC.

En la Fig. 67, se observa también la diferenciación a neuronas por microscopio convencional, mostrando las células la morfología propia de las neuronas.

El mismo ensayo se repitió a 21 días. Se determinó cada semana la expresión de los genes específicos de tejido neuronal, como Tau (Fig. 14^a), Nestina (Fig. 14C) y Nurr1 (Fig. 14B), y de NANOG. La concentración de los tres marcadores aumentó a lo largo de las tres semanas. También se analizó la desaparición a lo largo de las tres

semanas de diferenciación de NANOG. cDNA de cerebro humano (Ambion) se utilizó como control positivo y GAPDH como control de carga (HK).

Los cebadores utilizados para la amplificación fueron los siguientes: para nestina y NANOG fueron los usados en ejemplos previos, para Tau, (SEQ ID NO 17) 5'TCCAGTCGAAGATTGGGTCC3' como cebador directo y (SED ID NO 18) 5'GCTTGTGGGTTTCAATCTTTTATTT3' como cebador reverso, y para Nurr1 (SEQ ID NO 19) 5'GCTGTTGGGATGGTCAAAGAAG3' como cebador directo y (SEQ ID NO 20) 5'GGTTTCGAGGGCAAACGA3' como cebador reverso.

La RT-PCR se realizó en CFX96 (Bio-Rad), usando 50 ng de cDNA y SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories) El cDNA de las muestras se amplificó mediante cebadores específicos en las siguientes condiciones, 50°C 2 minutos, 95°C 10 minutos, 95°C 0,15 minutos, 60°C 1 minuto (40 ciclos), 72°C 1 minuto, curva de desnaturalización desde 65°C hasta 95°C.

Los resultados indican que las células DPPSC se pueden diferenciar a tejido neuronal ya que expresan los genes específicos de dicho tejido.

15 Diferenciación endodérmica. Diferenciación a hepatocitos

Se sembraron las células a diferenciar en placas de 24 pocillos en el medio de cultivo a una densidad de 25 × 10³ células por cm² en medio basal. Al día siguiente se cambió el medio de cultivo por medio de diferenciación, referido en la presente solicitud como "A: Medio de hepatocitos", en la sección "medios de cultivo usados en los diferentes ejemplos": medio basal sin FBS, 10 ng/ml HGF, 10 ng/ml FGF-4 (R&D Systems). Se cambió el medio cada 3 días durante 10 días.

Mediante técnicas de Q-RT-PCR se determinó que estas células se habían diferenciado a tejido hepático, expresando genes específicos de este tejido como HNF3 (Factor nuclear de hepatocitos). Se utilizaron células Ntera como control positivo y GAPDH como control de carga (HK). Como se observa en la Fig. 98 la concentración de HNF3 se ve aumentada en el día 4 respecto al día 0.

Para determinar la presencia de HNF3 en Q-RT-PCR se utilizó como cebador directo la secuencia (SEC ID NO 11) 5'CAGGAGAAACAGGGCCTACA3' y como cebador reverso la secuencia (SEC ID NO 12) 5'TGGGAGCAAAGATC CAAGAC3'.

En la Fig. 98 se observa también la diferenciación a hepatocitos por microscopio convencional, mostrando las células la morfología propia de este tipo de células.

El mismo ensayo se repitió a 21 días. Se determinó cada semana la expresión de los factores nucleares hepáticos (HNF1beta, HNF6) y GATA como genes específicos de tejido hepático, y de NANOG. La concentración de HNF1beta incrementó la primera semana y descendió las dos siguientes, en cambio, la expresión de HNF6 incrementó, demostrando la diferenciación endodérmica. También se analizó la desaparición a lo largo de las tres semanas de diferenciación de NANOG. cDNA de hígado humano (Ambion) se utilizó como control positivo y GAPDH como control de carga (HK) (Figure 13).

Los cebadores utilizados para la amplificación fueron los siguientes: para HNF6, (SEQ ID NO 21) 5'CTTAGCAGCATGCAAAAGGA3' como cebador directo y (SED ID NO 22) 5'TGCGTTCATGAAGAAGTTGC 3' como cebador reverso, para HNF1beta (SEQ ID NO 23) 5'ATTGCTGGTCGTTTGTGTG3' como cebador directo y (SEQ ID NO 24) 5'TACGTGTTTCATGCCGTTTCAT3' como cebador reverso, para GATA (SEQ ID NO 25) 5'TCCCTCTCCCTCCTCAAAT3' como cebador directo y (SEQ ID NO 26) 5'TTCCCCTAACCAAGATTGTGCG3' como cebador reverso, y para GAPDH (SEQ ID NO 1) como cebador directo y (SEQ ID NO 2) como cebador reverso.

La RT-PCR se realizó en CFX96 (Bio-Rad), usando 50 ng de cDNA y SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories) El cDNA de las muestras se amplificó mediante cebadores específicos en las siguientes condiciones, 50°C 2 minutos, 95°C 10 minutos, 95°C 0,15 minutos, 60°C 1 minuto (40 ciclos), 72°C 1 minuto, curva de desnaturalización desde 65°C hasta 95°C.

Los resultados indican que las células DPPSC se pueden diferenciar a tejido hepático ya que expresan los genes específicos de dicho tejido.

La presencia de NANOG se determinó en cada ensayo de diferenciación mesodérmica, endodérmica o ectodérmica. No se expresaba a partir de la segunda semana en los tres casos. Este resultado es remarcable debido a que la expresión prolongada en el tiempo del gen NANOG se podría relacionar con tumorigenicidad.

Ejemplo 6. Estudio citogenético y de microscopía electrónica de las DPPSC de la invención

Se realizó un estudio cada semana de citogenética y microscopía electrónica de barrido (SEM) (Zeiss EM900). Para realizar la microscopía electrónica, una sección de 1mm³ de pellet celular se fijó en una solución de formaldehído (2%), glutaraldehído (2,5%) y tampón Karnofsky con cacodilato (0,2 mol/L, pH 7,4). Después de 48h, las muestras se incrustaron en araldita. Las secciones ultra-finas se contrastaron con citrato y se observaron con microscopio electrónico (Zeiss EM900).

El estudio se realizó para ver si había anomalías de cromosomas o cambios de estructuras celulares de cultivo. Esto se realizó con el objetivo de aplicar estas células a nivel clínico en el futuro como terapia celular para la regeneración de tejidos.

En la Fig. 10 se muestra el citado estudio citogenético y SEM y puede apreciarse que no se observan ni anomalías ni fragmentación de cromosomas o de estructuras celulares. Para este estudio se analizaron 200 metafases y se observó más del 85% de las células sin anomalías o fragmentaciones. En 15% de las metafases restantes, se observaron roturas cromosómicas, las cuales son habituales como consecuencia de la técnica utilizada.

Resulta remarcable que no se detectaran anomalías o cambios estructurales en las células de la invención, este hecho indica que las células de la invención son activas, siendo capaces de diferenciarse en cualquiera de las tres líneas germinales.

Ejemplo 7. Comparación del fenotipo por la expresión de diferentes marcadores de diferentes tipos de células

Se comparó la expresión o no de los genes mostrados en la tabla 5, mediante FACS de las células de la invención DPPSC, MAPSC (cedidas por el Dr. Miguel Barajas de la Universidad de Navarra) células madre adultas multipotentes progenitoras), MSC (Células madre mesenquimales), IPS (induced pluripotent stem) y Ntera. TABLA 5 Muestra la expresión (+) o no (-) de los distintos marcadores en los diferentes tipos de células estudiadas. La “?” muestra marcadores no ensayados.

20
25
30
35

	DPPSC	MAPSC	MSC	IPS	Ntera
OCT3/4	+	+	+/-	+	+
SSEA4	+	+	-	+	+
CD13	+	+	+	+	+
SOX-2	+	?	-	+	+
NANOG	+	?	-	+	+
C-Myc	+	?	-	+	+
CD44	-	+	+	?	?
CD90	+	+	+	?	?
CD105	+	-	-	?	?
CD73	-	+	+	?	?
CD45	-	-	+	?	?

De los resultados mostrados en la Tabla 5, se puede concluir que las células de la invención expresan un patrón de marcadores específicos y diferentes a los obtenidos para células MAPSC y MSC.

40 Ejemplo 8. Ensayo comparativo de medios de cultivo

Se realizó una comparativa entre el Medio 2 (, el Medio para DPPSC) y, el Medio 3 (, y el Medio de MSC) con la finalidad de determinar cuál de ellos permitía obtener las células madre pluripotenciales de la presente invención. Para ello, se utilizó una muestra de la pulpa dental del mismo paciente. En el mismo día, la muestra fue repartida en dos partes; una parte en medio de MSC y la otra parte en medio de DPPSC. Se mantuvo con la misma concentración de sembrado durante 3 semanas y se observó la gran diferencia de morfología y de fenotipo. En particular, se observó que las células que se sembraron en medio 2 eran pequeñas, entre 5 y 8 micras, y con la morfología típica de las células de la invención, mientras que las que se sembraron en medio 3, eran más grandes y alargadas. Esto demuestra que las células DPPSC solo pueden vivir en su medio escrito. La Fig. 11 muestra las células que se cultivaron en el medio 2 a la izquierda (Fig. 11A) y las células que se cultivaron en el medio 3 a la derecha (Fig. 11B).

Ejemplo 9. Análisis mediante FACS del fenotipo inmunológico

55 El inmuno-fenotipo de una población fresca de pulpa dental obtenida del tercer molar representativa de donantes a diferentes edades, inmediatamente obtenida después de la extracción, se analizó mediante FACS. Se examinó la expresión de los marcadores de pluripotencialidad SSEA, Oct3/4 y NANOG (Fig. 15) en tejido de pulpa de donantes de diferentes edades en el mismo día de la extracción (n=20 muestras) como representación de la presencia de la subpoblación de DPPSC. Se observó que todas las muestras analizadas presentaban DPPSC.

60 El porcentaje medio de toda la expresión, reveló que había expresión de los marcadores, SSEA3, Oct3/4 y Nanog. Con el fin de relativizar la presencia de los marcadores específicos de DPPSC, con la edad de los pacientes,

los porcentajes se sometieron a análisis de regresión considerando como variable independiente la (edad) y como dependiente (diferentes marcadores). El análisis de correlación teniendo en cuenta Edad-SSEA4 mostró un valor de p 0,06 (significativo) y un coeficiente de correlación de 0,43, mostrando un incremento del porcentaje de SSEA4 correlativo al incremento de edad. La correlación Edad-Oct3/4 mostró un valor p 0,8 (no significativo) y un coeficiente de correlación de -0,034, indicando que existía una correlación negativa entre ambas variables, pero que no era significativa. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para la expresión de Oct3/4 la expresión se mantenía constante a diferentes edades. Finalmente, la correlación Edad-Nanog, con un valor de p 0,08 (significativo), mostró un coeficiente de correlación -0,48, lo que significaba que el porcentaje de Nanog descendía a medida que incrementaba la edad de la muestra obtenida.

10

Ejemplo 10. Determinación de la expresión de los marcadores mediante Q-RT-PCR

El RNA celular total de las muestras de DPPSC en pases 5,10 y 15 (a partir de aquí, referidas como P5, P10 y P15, respectivamente), H-Ntera, HDPMSC, y cada semana para las células diferenciadas se extrajo usando Trizol (Invitrogen). 2µg de RNA se trataron con DNAsa I (Invitrogen) y se realizó su transcripción reversa mediante la M-MLV transcriptasa reversa (Invitrogen). Se analizó la eficacia a diferentes concentraciones de cDNA (1, 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001 diluciones) para todos los cebadores de los genes marcadores de pluripotencia, usando las células Ntera como controles positivos. Se realizó la RT-PCR cuantitativa en CFX96 (Bio-Rad). Las reacciones se realizaron con 50ng de cDNA y SYBER Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Las muestras de cDNA se amplificaron usando cebadores específicos en las siguientes condiciones: 50,0°C 2 minutos/ 95°C 10 minutos/ 95°C 0,15 minutos/ 60,0°C 1 minuto/ (40 ciclos) 72°C 1 minuto/ curva de desnaturalización de 65°C a 96°C: Incremento 0,5°C cada 0,05 minutos. La expresión de los genes de interés (SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6 y los cebadores usados para la amplificación de Oct3/4 (SEQ ID NO 27) 5'GACAGGGGGGAGGGGAGGAGCTAGG 3' como cebador directo y (SEQ ID NO 28) 5'CTTCCCTCCAACCGATTGCCCAAAC3' como cebador reverso, fueron normalizados contra el gene constitutivo GAPDH en todas las muestras, y la expresión relativa de cada gene se analizó según el método 2_ΔΔCt.

25

Ejemplo 11. Caracterización de DPPSC versus DPMSC

A nivel genético, se demostró por Q-RT-PCR que las DPPSC, a P15, expresan genes de las tres capas embrionarias como Oct3/4+, NANOG+, hFLK-1+, HNF3beta+, Nestin+, Lin28+, Sox2+, Myc+. DPMSC se usaron como control negativo y células Ntera como control positivo (Fig17). Las DPMSC solo expresan el gen hFLK-1. Los cebadores utilizados para la amplificación de hFLK-1, (SEQ ID NO 29) 5'TGGCATCGCGAAAGTGTATC3' como cebador directo y (SEQ ID NO 30) 5'AAAGGGAGGCGAGCATCTC3' como cebador reverso. Los cebadores utilizados para la amplificación de Myc, (SEQ ID NO 31).

35

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> UIC Universidad Internacional de Cataluna
 <120> Células madre pluripotentes obtenidas de pulpa dental.
 40 <130> P1454
 <150> ES 200930488
 <151> 2009-07-21
 <150> ES 200930488
 <151> 2009-07-21
 45 <160> 32
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 24
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador directo glyceraldehyde 3-phosphate deshydrogenase (GADPH)
 <400> 1
 tggtatcgtg gaaggactca tgac
 55 <210> 2
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 60 <223> cebador reverso glyceraldehyde 3 phosphate deshydrogenase (GADPH)
 <400> 2

24

	atgccagtga gcttcccgtt cagc	24
	<210> 3	
	<211> 26	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo human gen SOX2	
	<400> 3	
	gggaaatggg aggggtgcaa aagagg	26
10	<210> 4	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> cebador reverso human gen SOX2	
	<400> 4	
	ttcgtgagt gtggatggga ttggtg	26
	<210> 5	
	<211> 20	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo human gen NANOG	
	<400> 5	
25	aaagaatctt cacctatgcc	20
	<210> 6	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> cebador reverso human gen NANOG	
	<400> 6	
	gaaggaagag gagagacagt	20
	<210> 7	
35	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo gen osteocalcina	
40	<400> 7	
	ggtgcagagt ccagcaaagg	20
	<210> 8	
	<211> 20	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> cebador reverso gen osteocalcina	
	<400> 8	
	agcgcctggg tctctccta	20
50	<210> 9	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
55	<223> cebador directo gen nestina	
	<400> 9	
	caggagaaac agggcctaca	20
	<210> 10	
	<211> 20	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	

ES 2 611 922 T3

	<220>	
	<223> cebador reverso gen nestina	
	<400> 10	
	tgggagcaaa gatccaagac	20
5	<210> 11	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
10	<223> cebador directo hepatocyte nuclear factot (HNF3)	
	<400> 11	
	caggagaaac agggcctaca	20
	<210> 12	
	<211> 20	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> cebador reverso gen hepatocyte nuclear factor (HNF3)	
	<400> 12	
20	tgggagcaaa gatccaagac	20
	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> cebador directo gen APHL	
	<400> 13	
	gaaggtgaag gtcggagtca	20
	<210> 14	
30	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> cebador reverso gen APHL	
35	<400> 14	
	tggtactcac gacgtactca	20
	<210> 15	
	<211> 21	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo gen osteonectina	
	<400> 15	
	aggtatctgt gggagctaat c	21
45	<210> 16	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
50	<223> cebador reverso gen osteonectina	
	<400> 16	
	attgctgcac acctctc	18
	<210> 17	
	<211> 20	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo gen Tau	
	<400> 17	
60	tccagtcgaa gattgggtcc	20
	<210> 18	

	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
5	<223> cebador reverso gen tau	
	<400> 18	
	gctgtgggt ttcaatctt ttatt	26
	<210> 19	
	<211> 22	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo gen Nurr1	
	<400> 19	
15	gctgtggga tggtaaaga ag	22
	<210> 20	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> cebador reverso gen nurr1	
	<400> 20	
	ggttcgagg gcaaacga	18
	<210> 21	
25	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo hepatic nuclear factor HNF6	
30	<400> 21	
	cttagcagca tgcaaaagga	20
	<210> 22	
	<211> 20	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> cebador reverso hepatic nuclear factor HNF6	
	<400> 22	
	tgcggtcatg aagaagttgc	20
40	<210> 23	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
45	<223> cebador directo hepatic nuclear factor HFN1b	
	<400> 23	
	attgctggtc gttgtgtg	20
	<210> 24	
	<211> 20	
50	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> cebador reverso hepatic nuclear factor HFN1b	
	<400> 24	
55	tacgtgttca tgccgtcat	20
	<210> 25	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>	
	<223> cebador directo gen GATA	

ES 2 611 922 T3

	<400> 25	
	tccctcttcc ctctcaaat	20
	<210> 26	
	<211> 20	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> cebador reverso gen GATA	
	<400> 26	
10	ttccctaac cagattgtcg	20
	<210> 27	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> cebador directo gen oct3/4	
	<400> 27	
	gacaggggga ggggaggagc tagg	24
	<210> 28	
20	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> cebador reverso gen oct3/4	
25	<400> 28	
	cttccctcca accagttgcc caaac	25
	<210> 29	
	<211> 20	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo gen hkfl	
	<400> 29	
	tggcatcgcg aaagtgatc	20
35	<210> 30	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
40	<223> cebador reverso gen hkfl	
	<400> 30	
	aaagggagc gagcatctc	19
	<210> 31	
	<211> 26	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo gen Myc	
	<400> 31	
50	gcgtctctggg aaggagatc cggagc	26
	<210> 32	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
55	<220>	
	<223> cebador reverso gen Myc	
	<400> 32	
	ttgaggggca tcgtcgggg aggctg	26

REIVINDICACIONES

1. Célula madre pluripotente caracterizada porque se obtiene de pulpa dental y porque:
 - 5 expresa al menos los genes NANOG, SOX2, y expresa los marcadores SSEA4, OCT3/4 y CD105; y expresa los marcadores CD13, cMyc y CD90 y no expresa los marcadores CD34, CD45, CD73 y CD44.
 2. La célula madre de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque es una célula humana.
 - 10 3. La célula madre de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2 con número de acceso DSM ACC3002 dado por la institución DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.
 4. Cultivo que comprende una célula madre de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en un medio de cultivo que comprende al menos un factor de transcripción.
 - 15 5. El cultivo de acuerdo con la reivindicación 4 caracterizado porque el medio comprende al menos los factores de crecimiento EGF y PDGF, y al menos el factor de transcripción LIF.
 6. Procedimiento para obtener células madre pluripotenciales de acuerdo con cualquiera las reivindicaciones 1 a 3, que comprende los pasos de:
 - (a) disgregación del tejido de la pulpa dental aislada de un mamífero;
 - (b) separación de las células madre del tejido disgregado resultante de la etapa (a);
 - (c) cultivo de las células en un medio que presente al menos un factor de transcripción a una concentración de sembraje entre 40-60 cm²; y
 - 25 (d) aislamiento de una célula madre pluripotente que expresa al menos los genes NANOG, SOX2, SSEA4, OCT3/4, CD105, CD13, c-Myc y CD90, y no expresa los genes CD34, CD45, CD73 y CD44.
 7. Célula madre pluripotente obtenible mediante el procedimiento de la reivindicación 6.
 - 30 8. Composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de la célula madre pluripotente según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 ó 7, y un portador farmacéuticamente aceptable.
 9. Célula madre según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 ó 7 para su uso en la regeneración o reparación de tejidos.
 - 35 10. La célula madre para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la regeneración de tejido óseo.
 11. La célula madre para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la regeneración de tejido neuronal.
 - 40 12. La célula madre para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la regeneración de tejido hepático.
 13. La célula madre de acuerdo con la reivindicación 1, 2, 3 ó 7, para su uso en la fabricación *in vitro* de un tejido u órgano.
- 45

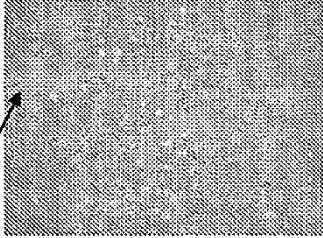


FIG. 1A

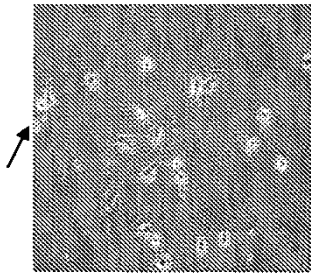


FIG. 1B

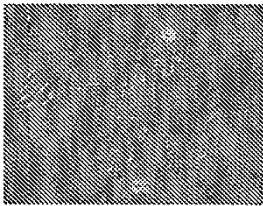


FIG. 1C

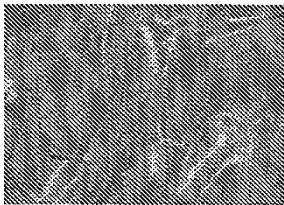


FIG. 1D

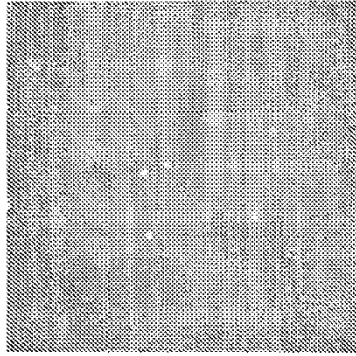


FIG.2

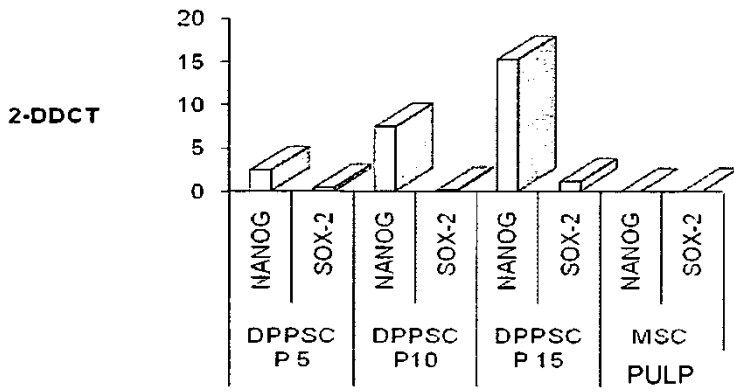


FIG.3



FIG.4

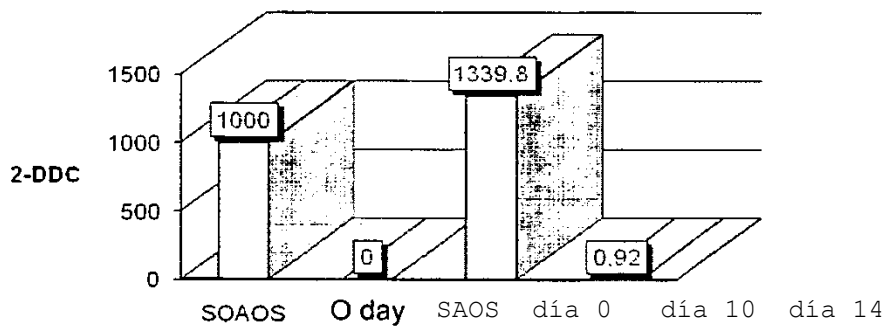


FIG.5

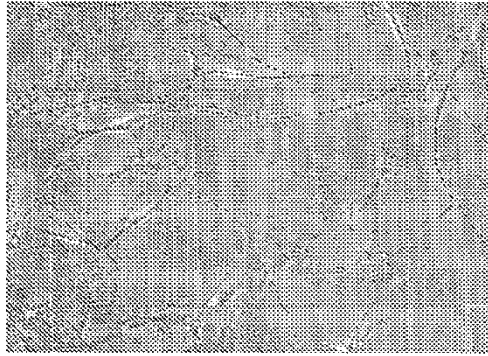


FIG.6

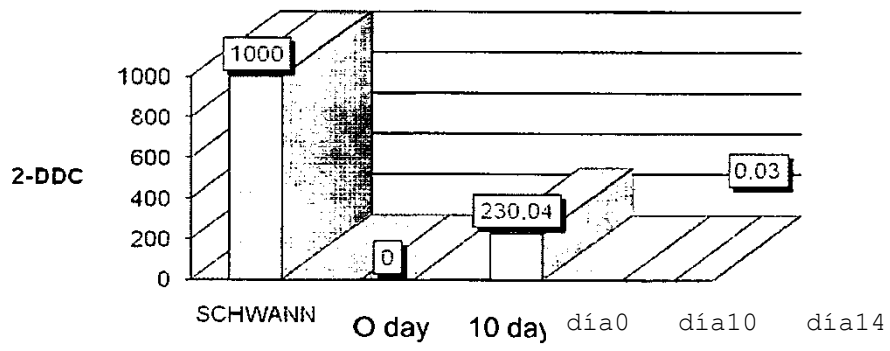


FIG.7

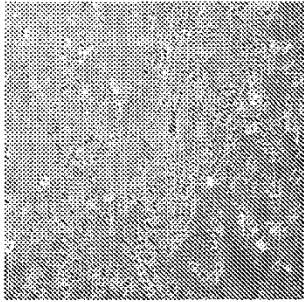


FIG.8

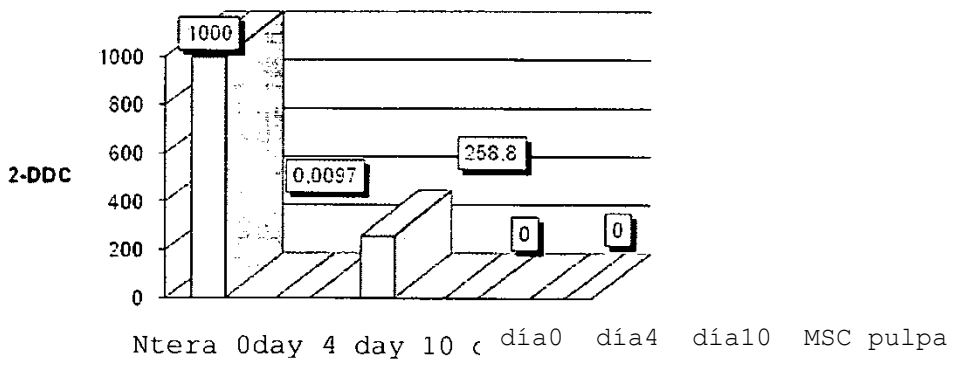


FIG.9

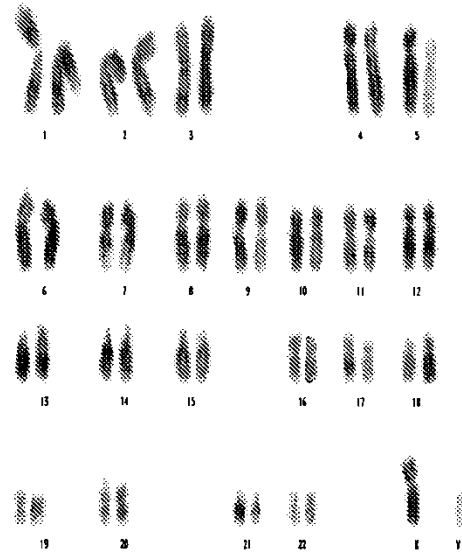


FIG.10



FIG.11A

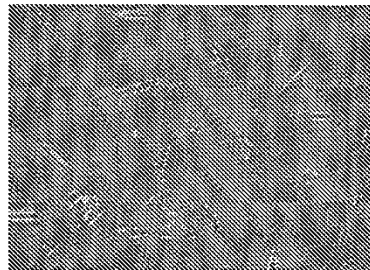


FIG.11B

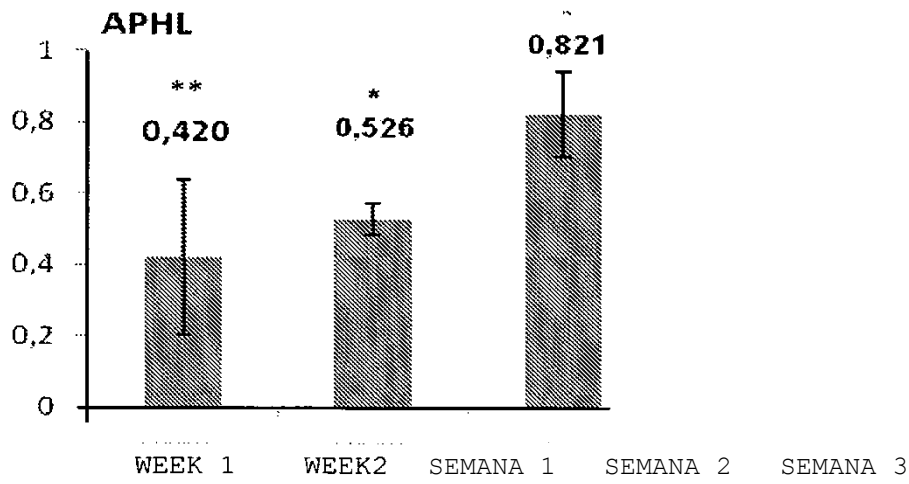


FIG.12A

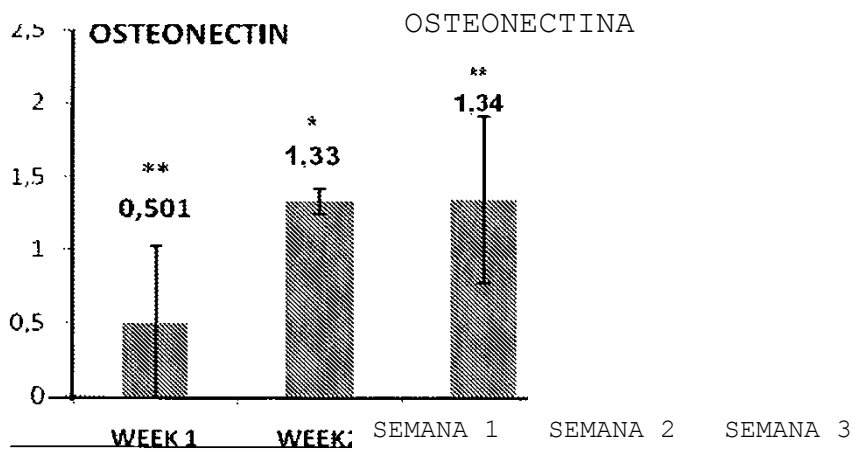


FIG.12B

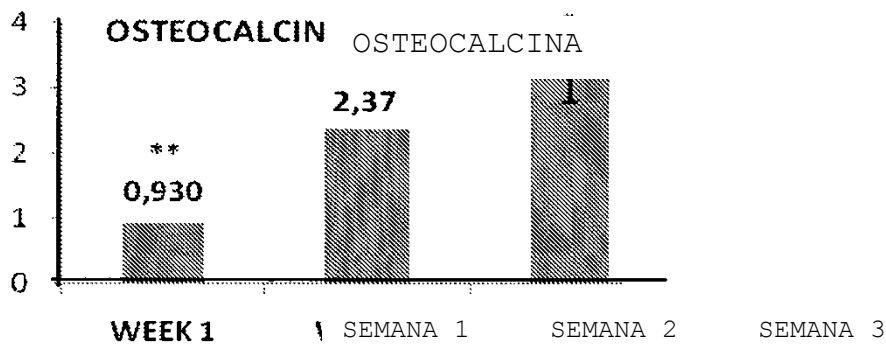


FIG 12C

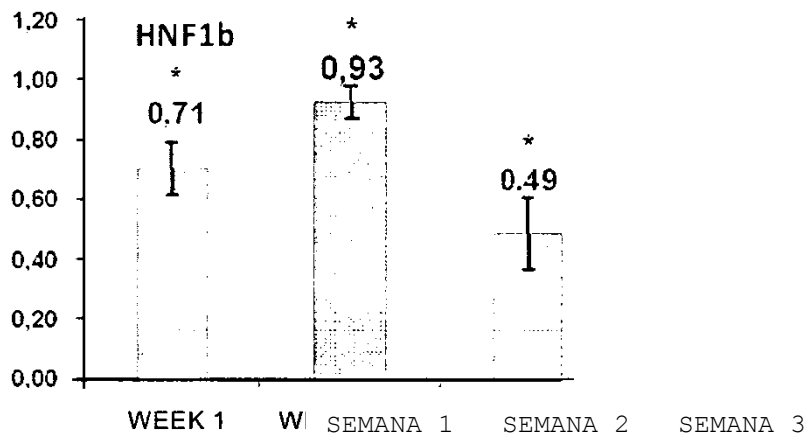


FIG. 13A

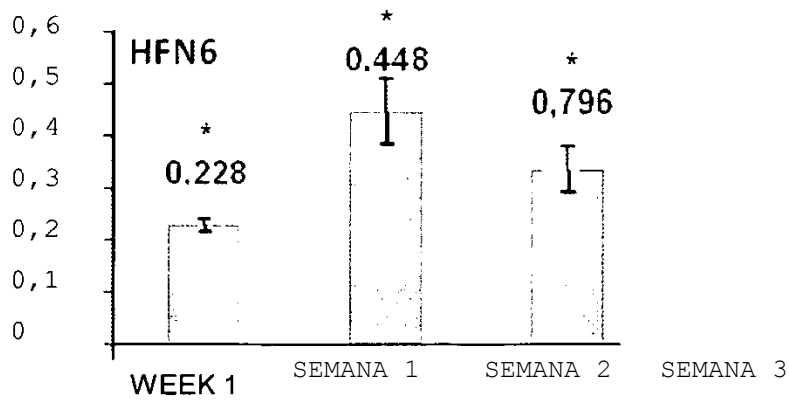


FIG. 13B

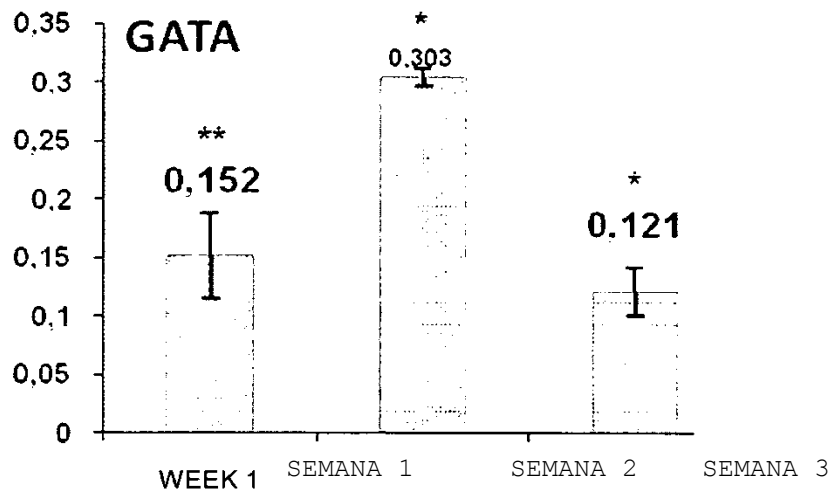


FIG. 13C

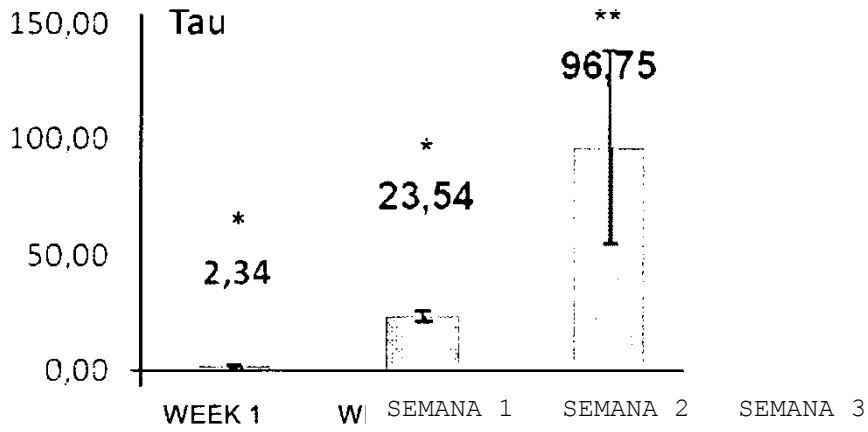


FIG. 14A

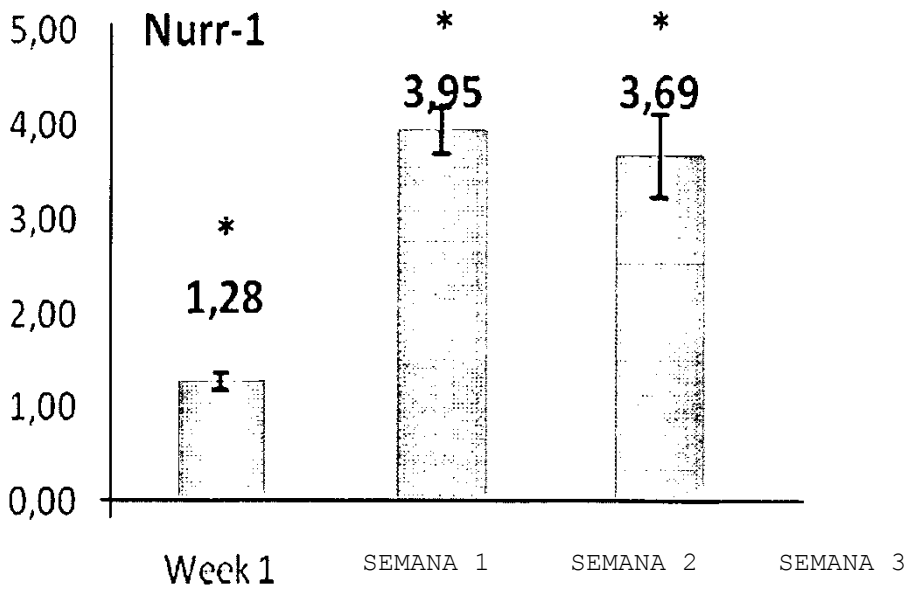


FIG. 14B

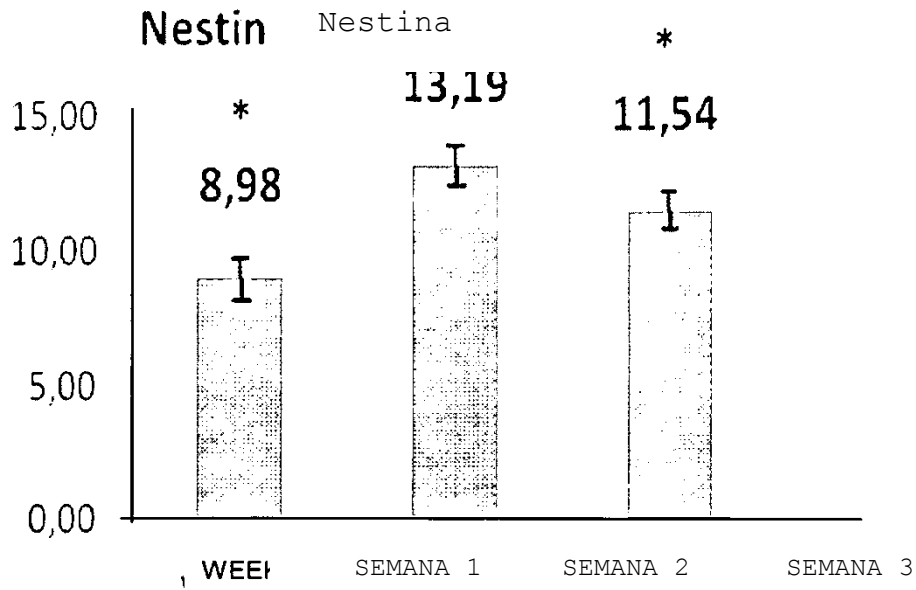


FIG. 14C

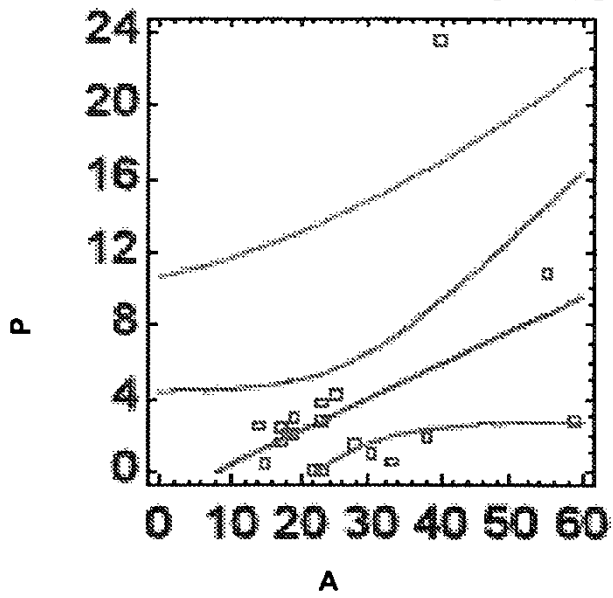
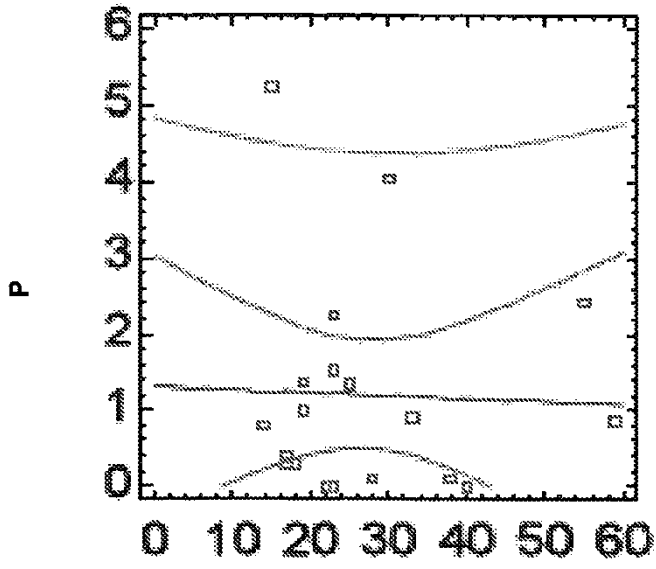
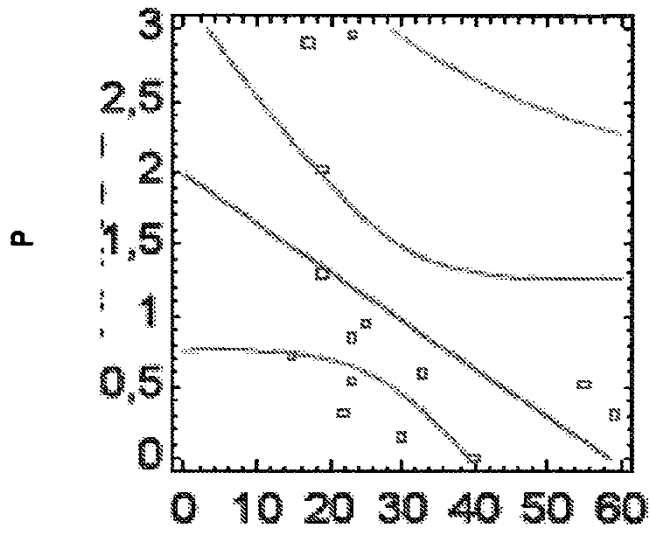


FIG.15A



A

FIG.15B



A

FIG.15C

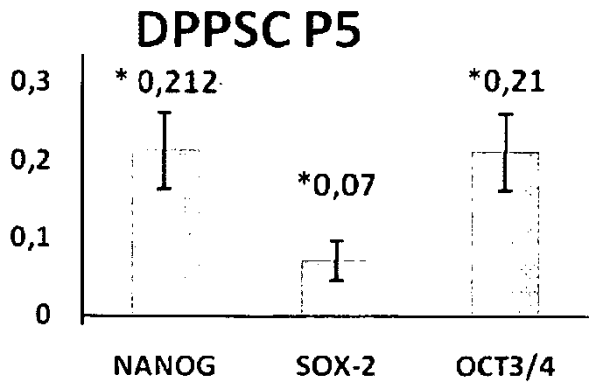


FIG. 16A

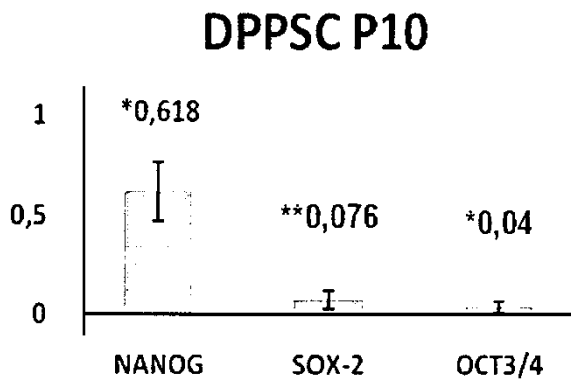


FIG. 16B

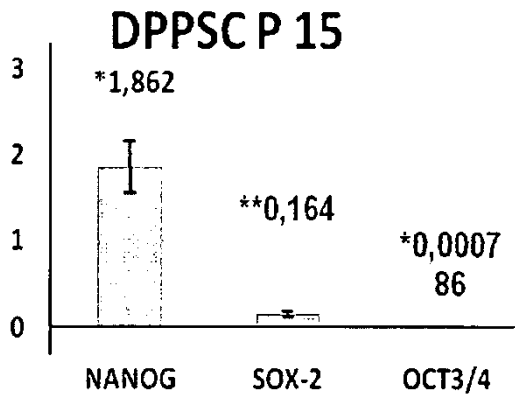
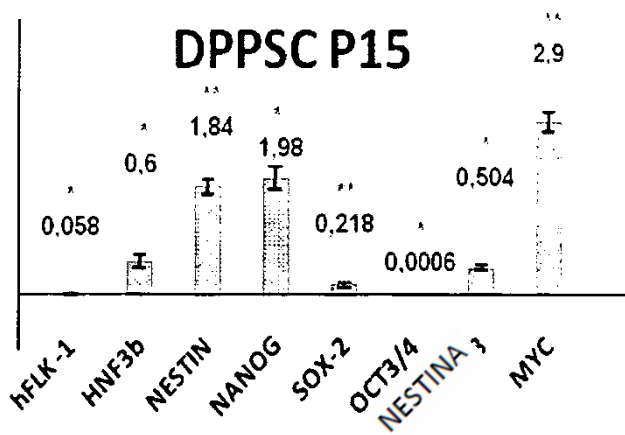


FIG. 16C



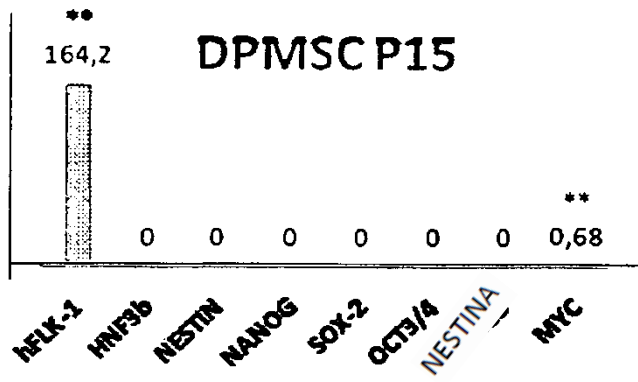


FIG. 17

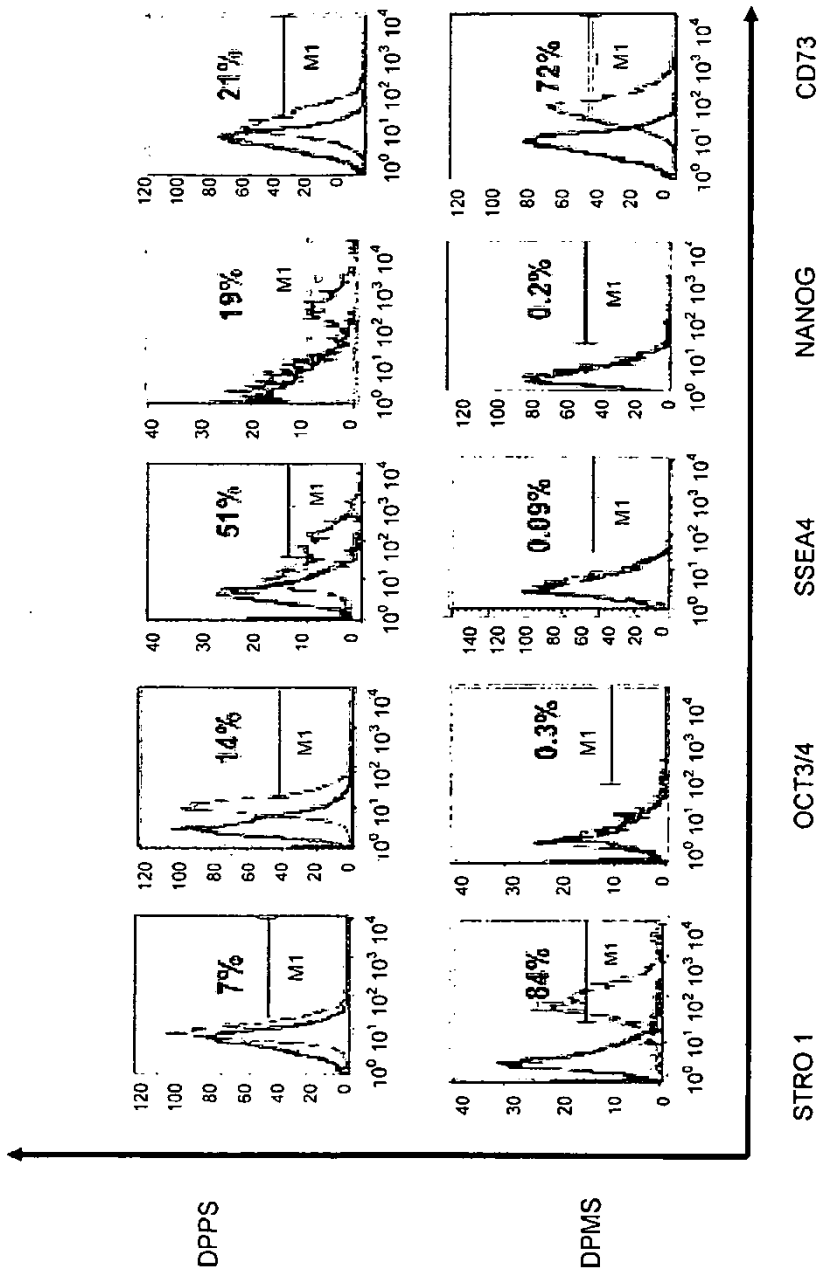


FIG. 18

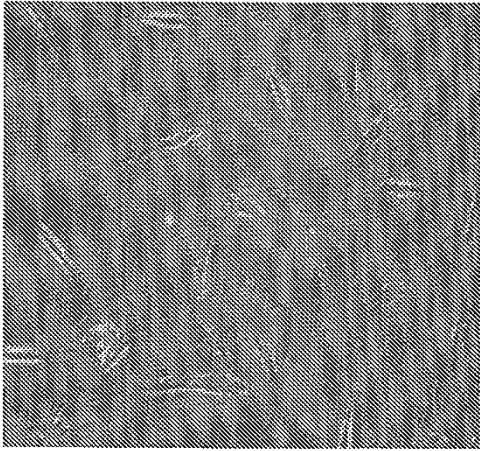


FIG. 19A

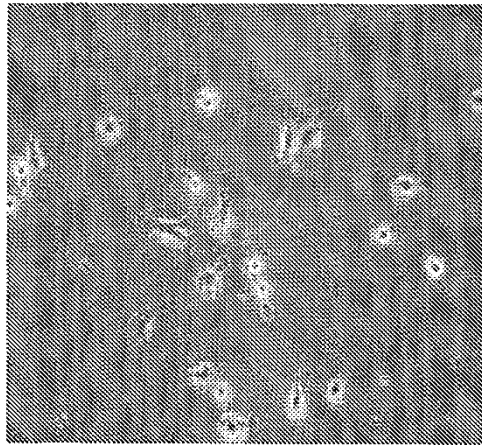


FIG. 19B

[

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- 10
- ES200930488 [0130] [0130]•

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- 15
- PRELLE et al. Establishment of pluripotent cell lines from vertebrate species, present status and future prospects *Cell Tissues Organs*, 1999, vol. 165, 220-236 [0011]
 - NIWA et al. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells *Nature*, 2000, vol. 24, 372-376 [0012]
 - VENABLE et al. Lectin binding profiles of SSEA-4 enriched, pluripotent human embryonic stem cell surfaces *BMC Dev Biol.*, 2005, vol. 21, 5-15 [0012]

20

 - YOUNG et al. Human pluripotent and progenitor cells display cell surface cluster differentiation markers cd10, cd13, cd56, and mhc class-I *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1999, vol. 221, 163-7 [0012]
 - JIANG et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow *Nature*, 2002, vol. 418, 41-47 [0013]

25

 - JIANG Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow *Nature*, 2002, vol. 418, 41-47 [0027]
 - NORIAKI et al. Evaluation of Pluripotency in Human Dental Pulp Cells *J. Oral Maxillofac Surg*, 2009, vol. 67, 501-506 [0028]

30

 - GRONTHOS et al. Postnatal human dental pulp stem cells in vitro and in vivo *PNAS*, 2000, vol. 97, 13625-13630 [0030]
 - KERKIS et al. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers *Cell Tissues Organs*, 2006, vol. 184, 105-116 [0032]
 - TODOROV et al. Multipotent progenitor cells isolated from adult human pancreatic tissue *Transplant Proc.*, 2005, vol. 37, 83420-1 [0033]

35

 - SMITH et al. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides *Nature*, 1988, vol. 336, 688-690 [0035]
 - HAYNESWORTH et al. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow *Bone*, 1992, vol. 13, 81-88 [0054]

40

 - JIANG et al. Multipotent adult progenitor cells from human bone marrow differentiate into hepatocyte-like cells induced by co-culture with human hepatocyte line *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2007, vol. 87, 414-418 [0054]
 - JIANG et al. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle and brain *Exp. Hematol.*, 2002, vol. 30, 896-904 [0054]

45