(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 641 547**

(51) Int. Cl.:

C12N 5/077	(2010.01)
C12N 5/0775	(2010.01)
A61K 35/35	(2015.01)
A61K 35/28	(2015.01)
A61P 17/00	(2006.01)
A61P 37/00	(2006.01)
A61P 43/00	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.09.2014** **PCT/US2014/056145**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **26.03.2015** **WO15042182**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2014** **E 14845486 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.07.2017** **EP 3046417**

(54) Título: **Métodos de uso de células derivadas de tejido adiposo en el tratamiento del fenómeno de Raynaud asociado con esclerodermia**

(30) Prioridad:

19.09.2013 US 201361880086 P
09.04.2014 US 201461977466 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.11.2017

(73) Titular/es:

CYTORI THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
3020 Callan Road
San Diego, California 92121, US

(72) Inventor/es:

FRASER, JOHN y
MAGALON, GUY

(74) Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 641 547 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

Métodos de uso de células derivadas de tejido adiposo en el tratamiento del fenómeno de Raynaud asociado con esclerodermia

CAMPO DE LA INVENCIÓN

Los aspectos de la presente invención se refieren al campo de medicina, específicamente, al estudio del dolor y el estudio de la fibrosis y el efecto del tejido adiposo y sus componentes en la modulación y/o mejora del dolor y/o la fibrosis.

ANTECEDENTES

Se estima que unas 86 millones de personas, o un tercio de todos los americanos, padecen dolor crónico. Mientras que el dolor agudo a menudo es una sensación normal que se desencadena para enviar una señal por una posible lesión, el dolor crónico es diferente. El dolor crónico persiste. Las señales de dolor se siguen disparando en el sistema nervioso durante semanas, meses, incluso años.

El origen del dolor puede ser un evento específico tal como un trauma físico, (por ejemplo, una espalda lesionada), una infección grave, o una causa en curso de dolor, por ejemplo, artritis, cáncer, infección del oído. Algunas personas también padecen dolor crónico en ausencia de cualquier lesión pasada o evidencia de daño corporal. Las dolencias del dolor crónico comunes incluyen dolor de cabeza, dolor lumbar, dolor por cáncer, dolor por artritis, dolor neurogénico (dolor resultante del daño a los nervios periféricos o al propio sistema nervioso central), y dolor psicogénico (el dolor no se debe a enfermedades o lesiones pasadas o cualquier signo visible de daño dentro o fuera del sistema nervioso).

Una persona puede tener dos o más afecciones de dolor crónico coexistentes. A menudo, no es evidente si estos trastornos comparten una causa común.

La esclerodermia es una enfermedad reumática autoinmune asociada con fibrosis y dolor crónico, y puede dar lugar a diversas complicaciones diferentes. La esclerosis sistémica, o esclerodermia, está caracterizada por anomalías microvasculares y fibrosis progresiva de la piel y los órganos internos. Los individuos afectados con esclerodermia a menudo se quejan de la discapacidad de las actividades diarias relacionadas con la participación de las manos. Las intervenciones terapéuticas en las manos con esclerodermia se han centrado principalmente en el tratamiento de manifestaciones vasculares, pero no la fibrosis.

Hoy en día no existe ningún tratamiento eficaz para el dolor o la fibrosis asociada con esclerodermia. Por consiguiente, existe la necesidad en el campo médico de mejores composiciones y métodos para la supresión del dolor y la modulación de la fibrosis, por ejemplo, en esclerodermia y otros trastornos caracterizados por fibrosis y/o dolor crónico.

Scuderi et al. "Human adipose-derived stromal cells for cell-based therapies in the treatment of systemic sclerosis", Cell Transplantation 2013, vol. 22, n.º 5, págs. 779-795 describe el uso de células madre derivadas de tejido adiposo en el tratamiento de pacientes con esclerodermia.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

Se describe en el presente documento un método de tratamiento o modulación del dolor, fibrosis, o ambos en un individuo, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo, en el que la cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para causar una mejora detectable en dicho dolor, fibrosis, o el dolor y la fibrosis.

También se describe en el presente documento un método de tratamiento de afecciones sensoriales anormales tales como disestesia, alodinia e hiperalgesia, en un individuo, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo, en el que la cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para causar una mejora detectable en dicho dolor.

En un caso específico, dicho método comprende identificar un individuo que necesita alivio del dolor, o un individuo que padece dolor. En otro caso específico, dicho método comprende adicionalmente determinar uno o más primeros niveles de dolor en dicho individuo antes de la administración de dichas células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo, y determinar uno o más segundos niveles de dolor en dicho individuo después de la administración de dichas células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo, en el que dicha cantidad terapéuticamente eficaz de células madre y regenerativas derivadas tejido adiposo reduce dicho uno o más segundos niveles de dicho dolor en comparación con dicho uno o más primeros niveles de dolor.

En un caso más específico, dicha cantidad terapéuticamente eficaz de células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo da como resultado una mejora detectable en dicho dolor que es mayor, o más duradera que, la mejora debido a la administración de un placebo.

En un caso más específico, dicho uno o más primeros niveles de dolor y dicho uno o más segundos niveles de dolor se determinan por una escala de evaluación de dolor. En un caso más específico, dicha escala de evaluación de dolor es la escala numérica de intensidad de dolor; la escala de evaluación de la calidad del dolor; la escala simple de intensidad de dolor descriptiva; la escala analógica visual; la escala de clasificación del dolor Wong-Baker FACES; la escala FLACC; la escala CRIES; o la escala COMFORT.

En otro caso específico, dicho método comprende adicionalmente determinar un primer nivel de uno o más indicios fisiológicos de dolor en dicho individuo antes de la administración de dichas células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo, y determinar un segundo nivel de uno o más indicios fisiológicos de dolor en dicho individuo después de la administración de dichas células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo, en el que dicha cantidad terapéuticamente eficaz de células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo reduce dicho segundo nivel en comparación con dicho primer nivel.

En un caso más específico, dicho indicio fisiológico de dolor es el ritmo cardiaco en el individuo. En un caso más específico, el ritmo cardiaco en dicho individuo es menor después de dicha administración en comparación con dicho ritmo cardiaco en dicho individuo antes de dicha administración. En otro caso más específico, dicho indicio fisiológico de dolor es la sistólica de dicho individuo. En un caso más específico, dicha sistólica de dicho individuo es menor después de dicha administración en comparación con dicha sistólica en dicho individuo antes de dicha administración. En otro caso más específico, dicho indicio fisiológico de dolor es la diastólica de dicho individuo. En un caso más específico, dicha diastólica de dicho individuo es menor después de dicha administración en comparación con dicha diastólica en dicho individuo antes de dicha administración.

En otro ejemplo del método de tratamiento de dolor, el dolor es dolor neuropático. En un caso específico, dicho dolor neuropático es causado por neuropatía diabética. En otro caso específico, dicho dolor neuropático es causado por una lesión a un nervio en dicho individuo. En otro caso específico, dicho dolor neuropático es causado por un fármaco. En ciertos casos específicos, dicho fármaco es o comprende un fármaco contra el cáncer que contiene platino, por ejemplo, oxaliplatino, carboplatino o cisplatino, u otro fármaco quimioterapéutico tal como paclitaxel o vincristina. En otro caso, el dolor neuropático es causado por un virus, por ejemplo, una enfermedad vírica tal como varicela zoster, herpes (por ejemplo, herpes simple) o virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). En aún otra realización el dolor es causado por una lesión por radiación, por ejemplo, lesión por radiación que es parte de un tratamiento contra el cáncer. En otro caso específico, dicho dolor neuropático es causado por inflamación, por ejemplo, neuroinflamación, neuritis.

En otro ejemplo del método de tratamiento de dolor, el dolor es dolor inflamatorio. En otro caso, dicho dolor es dolor óseo. En un caso específico, dicho dolor óseo está asociado con o es causado por cáncer. En otro caso, dicho dolor es causado por cáncer. En otro caso, dicho dolor es causado por o asociado por vulvodinia, dolor causado por o asociado con cistitis intersticial, o dolor causado por enfermedad articular degenerativa tal como osteoartritis. En ciertas realizaciones, dicho dolor no responde a la terapia con esteroides. En ciertos otros casos, dicho dolor no responde a terapia con antiiflamatorios no esteroideos. En ciertos otros casos, dicho dolor no responde a terapia con opioides. En ciertos otros casos, dicho dolor no responde a terapia no específica o con opioides mu/delta mezclados.

En un caso específico de cualquiera de los ejemplos anteriores, dichas células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo comprenden células que son CD31-. En un caso más específico, dichas células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo son adicionalmente CD34+, por ejemplo, las células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo son CD31- y CD34+. En un caso más específico, dichas células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo son adicionalmente CD45-. En otras palabras, en algunos casos, las células son CD31-, CD34+, CD45-. En otro caso, dichas células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo son CD146+. En algunos

casos, las células son CD31-, CD34+, CD45-, CD146+. En otro caso, dichas células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo comprenden células que son CD45+, y en una realización más específica son CD45+ y CD206+.

En ciertos casos, dichas células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo se formulan para que se administren por vía local, por ejemplo, de forma tópica o por inyección local (subcutánea, intramuscular, y similares). En ciertos otros casos, dichas células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo se formulan para que se administren por vía sistémica, por ejemplo, intravenosa o intraarterial o a través del sistema linfático.

Los casos preferidos incluyen métodos de modulación de dolor en un sujeto que lo necesite, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de células regenerativas derivadas de tejido adiposo al sujeto. En algunos casos, estos métodos comprenden además seleccionar, identificar, o clasificar el sujeto como un individuo que experimenta dolor. En algunos casos, dicha selección, identificación, o clasificación se hace por un médico o evaluación clínica o de diagnóstico. En algunos casos, dichos métodos comprenden además determinar o medir el dolor en dicho sujeto, antes, después, o durante la administración de dichas células regenerativas derivadas de tejido adiposo.

Otros casos se refieren a métodos de modulación de fibrosis en un sujeto que lo necesite, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas a dicho sujeto. En algunos casos, dichos métodos comprenden además seleccionar, identificar, o clasificar dicho sujeto como un individuo que experimenta fibrosis o que tiene una enfermedad fibrótica. En algunos casos, dicha selección, identificación, o clasificación se hace por un médico o evaluación clínica o de diagnóstico. En algunos casos, dichos métodos comprenden además determinar o medir fibrosis o un marcador de la misma, tal como la cantidad de o nivel de TNF-alfa, en dicho sujeto o en una muestra biológica obtenida de dicho sujeto antes, después, o durante la administración de dichas células regenerativas derivadas de tejido adiposo. Los ejemplos adicionales se refieren a métodos de mejora del intervalo de movimiento en una articulación en un sujeto que lo necesite, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas a dicho sujeto. En algunos casos, dichos métodos comprenden además seleccionar, identificar, o clasificar dicho sujeto como un individuo que experimenta una pérdida de movilidad de las articulaciones o una reducción en el intervalo de movimiento de una articulación. En algunos casos, dicha selección, identificación, o clasificación se hace por un médico o evaluación clínica o de diagnóstico. En algunos casos, dichos métodos comprenden además determinar o medir la movilidad o intervalo de movimiento de una articulación de dicho sujeto, antes, después, o durante la administración de dichas células regenerativas derivadas de tejido adiposo. En cualquiera de los casos mencionados anteriormente, dichas células regenerativas derivadas de tejido adiposo pueden comprender células madre. En cualquiera de los casos mencionados anteriormente, dichas células regenerativas derivadas de tejido adiposo pueden comprender células precursoras. En cualquiera de los casos mencionados anteriormente, dichas células regenerativas derivadas de tejido adiposo pueden comprender células progenitoras. En cualquiera de los casos mencionados anteriormente, dicho sujeto puede tener esclerodermia.

DEFINICIONES

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente", cuando hace referencia a un valor numérico indicado, indica un valor dentro de más o menos el 10 % del valor numérico indicado.

Como se usa en el presente documento, el término "derivado" significa aislado de o purificado de otra forma. Por ejemplo, las células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo están aisladas del tejido adiposo. El término "derivado" no incluye células que se cultivan ampliamente (por ejemplo, colocadas en condiciones de cultivo en las que la mayoría de las células en división experimentan 3, 4, 5 o menos, duplicaciones celulares), de células aisladas directamente de un tejido, por ejemplo, tejido adiposo, o células cultivadas o expandidas de aislados primarios. Por consiguiente, "células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo" se refiere a células obtenidas a partir de tejido adiposo, en las que las células no se cultivan ampliamente.

Como se usa en el presente documento, una célula es "positiva" para un marcador particular cuando ese marcador es detectable. Por ejemplo, una célula regenerativa derivada de tejido adiposo es positiva para, por ejemplo, CD73 debido a que CD73 es detectable en una célula madre o regenerativa derivada de tejido adiposo en una cantidad detectablemente mayor que el fondo (en comparación con, por ejemplo, un control de isótopo o un control negativo experimental para cualquier ensayo dado). Una célula también es positiva para un marcador cuando ese marcador

se puede utilizar para distinguir la célula de al menos otro tipo de célula, o se puede utilizar para seleccionar o aislar la célula cuando está presente o se expresa por la célula.

En algunos contextos, la expresión "tejido adiposo" se refiere a un tejido que contiene múltiples tipos de células que incluyen adipocitos y células vasculares. Tejido adiposo incluye múltiples tipos de células regenerativas, incluyendo células madre adultas (ASC) y células progenitoras endoteliales y precursoras. Por consiguiente, el tejido adiposo se refiere a grasa, que incluye el tejido conectivo que almacena la grasa.

En algunos contextos, la expresión "unidad de tejido adiposo" se refiere a una cantidad discreta o medible de tejido adiposo. Una unidad de tejido adiposo se puede medir determinando el peso y/o volumen de la unidad. En referencia a la divulgación en el presente documento, una unidad de tejido adiposo puede referirse a la totalidad de la cantidad de tejido adiposo extraído de un sujeto, o una cantidad que es menor que la toda la cantidad del tejido adiposo extraído de un sujeto. Por lo tanto, una unidad de tejido adiposo se puede combinar con otra unidad de tejido adiposo para formar una unidad de tejido adiposo que tiene un peso o volumen que es la suma de las unidades individuales.

En algunos contextos, el término "porción" se refiere a una cantidad de un material que es menor que una totalidad. Una porción menor se refiere a una cantidad que es menor del 50 %, y una porción mayor se refiere a una cantidad mayor del 50 %. Por lo tanto, una unidad de tejido adiposo que es menor que la toda la cantidad de tejido adiposo extraído de un sujeto es una porción del tejido adiposo extraído.

Como se usa en el presente documento, "células regenerativas" se refiere a cualquier célula heterogénea u homologa obtenida usando los sistemas y métodos de los ejemplos descritos en el presente documento que causan o contribuyen a una regeneración completa o parcial, restauración, o sustitución de la estructura o función de un órgano, tejido, o unidad o sistema fisiológico para proporcionar de esta forma un beneficio terapéutico, estructural o cosmético. Los ejemplos de células regenerativas incluyen: ASC, células endoteliales, células precursoras endoteliales, células progenitoras endoteliales, macrófagos, fibroblastos, pericitos, células de músculo liso, preadipocitos, adipocitos diferenciados o desdiferenciados, queratinocitos, células progenitoras y precursoras unipotentes y multipotentes (y su progenie), y linfocitos.

En algunos contextos, la expresión "célula progenitora" se refiere a una célula que es unipotente, bipotente, o multipotente con la capacidad de diferenciarse en uno o más tipos de células, que realizan una o más funciones específicas y que tienen capacidad limitada o ninguna capacidad para auto-renovarse. Algunas de las células progenitoras divulgadas en el presente documento pueden ser pluripotentes.

En algunos contextos, la expresión "células derivadas de tejido adiposo" se refiere a células extraídas de tejido adiposo que se ha procesado para separar el componente celular activo de los adipocitos maduros y el tejido conectivo. La separación puede ser parcial o completa. Es decir, las "células derivadas de tejido adiposo" pueden o no contener algunos adipocitos y tejido conectivo y pueden o no contener algunas células que están presentes en agregados o en forma parcialmente desagregada (por ejemplo, un fragmento de sangre o vaso linfático que comprende dos o más células que se conectan por matriz extracelular). Esta fracción se denomina en el presente documento como "células derivadas de tejido adiposo", "células regenerativas derivadas de tejido adiposo" o "ADC". Típicamente, ADC hace referencia al sedimento de células obtenido por lavado y separación de las células del tejido adiposo. El sedimento se obtiene típicamente centrifugando una suspensión de células de manera que las células se agreguen en la parte inferior de un recipiente de centrífuga, o concentrando de forma alternativa las células de una forma diferente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **figura 1** es una fotografía que muestra los dedos de un paciente que se marcan en el sitio de inyección de las células derivadas de tejido adiposo, como se describe en el Ejemplo 1, más adelante.

La **figura 2** es una fotografía que muestra una incisión que se hace en un sitio de inyección, como se describe en el Ejemplo 1, más adelante.

La **figura 3** es una fotografía que muestra la administración de las células derivadas de tejido adiposo al sitio de inyección, como se describe en el Ejemplo 1, más adelante.

La **figura 4** es un gráfico que muestra las puntuaciones de gravedad de Raynaud de los pacientes en el momento del tratamiento, y dos veces después del tratamiento, como se describe en el Ejemplo 1 más adelante.

La **figura 5** es un gráfico de barras que muestra el número de pacientes del estudio que muestra >30 % de empeoramiento en las puntuaciones de gravedad de Raynaud, el 10-33 % de empeoramiento en las puntuaciones de gravedad de Raynaud, puntuaciones de gravedad de Raynaud inalteradas (-10 % a +10 %), puntuaciones de gravedad de Raynaud mejoradas (10 %-33 %), y mayor mejora en las puntuaciones de gravedad de Raynaud (>33 %).

La **figura 6** es un gráfico que muestra las puntuaciones del cuestionario de evaluación de salud de esclerodermia (SHAQ) de los pacientes en el valor inicial (tiempo de tratamiento) y dos meses después del tratamiento, como se describe en el Ejemplo 1, más adelante.

La **figura 7** es un gráfico de barras que muestra el número de pacientes del estudio que muestra un >30 % de empeoramiento en puntuaciones SHAQ, un 10-33 % de empeoramiento en puntuaciones SHAQ, puntuaciones SHAQ inalteradas (-10 % a +10 %), puntuaciones SHAQ mejoradas (10 %-33 %), y mayor mejora en puntuaciones SHAQ (>33 %).

La **figura 8** es un gráfico que las muestra puntuaciones de Cochin de los pacientes en el momento del tratamiento, y dos meses después del tratamiento, como se describe en el Ejemplo 1, más adelante.

La **figura 9** es una fotografía de las manos de un paciente del estudio que representa el movimiento asociado con la mecanografía dos meses después del tratamiento, como se describe en el Ejemplo 1, más adelante.

La **figura 10** es una fotografía de las manos de un paciente del estudio que representa los movimientos de mano utilizados en la manipulación de tijeras dos meses después del tratamiento, como se describe en el Ejemplo 1, más adelante.

La **figura 11** es un gráfico que muestra las puntuaciones iniciales, 2 meses de seguimiento, y 6 meses de seguimiento para dolor de manos (escala analógica visual "VAS"); escala de Cochin de función de las manos ("CHFS"), puntuación de afección de Raynaud ("RCS"); y cuestionario de evaluación de salud de esclerodermia ("SHAQ"), como se describe en el Ejemplo 1, más adelante.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA MATERIA OBJETO DIVULGADA

Métodos de tratamiento de dolor

En el presente documento se describen métodos de tratamiento del dolor que comprenden la administración de células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo como se describen y se preparan en el presente documento y en la Patente de Estados Unidos N.º 7.390.484.

El dolor se define en general como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con daño fisular real o potencial o descrito en términos de dicho daño. Merskey H, Bogduk N, eds., Classification of Chronic Pain, International Association for the Study of Pain (IASP) Task Force on Taxonomy, IASP Press: Seattle, 209-214, 1994. Debido a que la percepción de dolor es altamente subjetiva, es una de las patologías más difíciles de diagnosticar y tratar de forma eficaz. El dolor puede ser agudo, lo que significa que se induce inmediatamente después de un estímulo (por ejemplo, exposición a la llama, impacto brusco o directo, o evento isquémico repentino), o crónico, lo que significa que es persistente y/o recurrente en intervalos relativamente frecuentes.

En el presente documento se describe un método de tratamiento de un individuo que tiene dolor, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, en el que la cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para causar una mejora detectable en el dolor o un síntoma asociado con el dolor. En un caso, se identifica un paciente como en necesidad de supresión o tratamiento del dolor. En un caso, dicho método comprende adicionalmente determinar un primer nivel de dolor en dicho individuo antes de la administración de dichas células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo, y determinar un segundo nivel de dolor en dicho individuo después de la administración de dichas células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo, en el que dicha cantidad terapéuticamente eficaz de células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo reduce dicho segundo nivel de dicho dolor en comparación con dicho primer nivel de dolor.

En ciertos casos, la cantidad terapéuticamente eficaz de células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo, cuando se administran, da como resultado una mayor, o más duradera, mejora del dolor en el individuo en comparación con la administración de un placebo.

En ciertos casos, el dolor es dolor nociceptivo. El dolor nociceptivo es causado convencionalmente cuando se liberan estímulos nocivos tales como mediadores químicos inflamatorios después de una lesión tisular, enfermedad, o inflamación y se detectan mediante el funcionamiento normal de receptores sensoriales (nociceptores) en el sitio de la lesión. Véase, por ejemplo, Koltzenburg, M. Clin. J. of Pain 16: S131-S138 (2000). Los ejemplos de causas de dolor nociceptivo incluyen, pero sin limitación, quemaduras químicas o térmicas, cortes y contusiones de la piel, osteoartritis, artritis reumatoide, tendinitis y dolor miofascial. En ciertos casos, el dolor nociceptivo se estimula por la inflamación.

En ciertos otros casos, el dolor es dolor neuropático. El dolor neuropático refleja lesiones o deterioro del sistema nervioso, y se ha definido como "dolor iniciado o causado por una lesión principal o disfunción en el sistema nervioso". Merskey H, Bogduk N, eds., Classification of Chronic Pain, International Association for the Study of Pain (IASP) Task Force on Taxonomy, IASP Press: Seattle, 209-214, 1994. En un caso específico, el dolor neuropático está caracterizado por la excitabilidad alterada de neuronas periféricas. En otros casos específicos, el dolor neuropático incluye, pero sin limitación, dolor asociado con neuropatía diabética, neuralgia postherpética, neuralgia trigeniminal, inflamación (por ejemplo, neuroinflamación, neuritis), y dolor posterior a un ictus. En ciertos casos, el dolor neuropático es continuo, episódico, y se describe como, por ejemplo, quemazón, hormigueo, pinchazos, punzante, similar a una descarga eléctrica, lacerante, constrictivo, dolor profundo, o espasmódico. En ciertos otros casos, el individuo que tiene dolor neuropático experimenta de forma adicional déficit sensorial parcial o completo, sensaciones desagradables anormales o desconocidas (disestesia), dolor resultante de estímulos no nocivos, o percepción desproporcionada de dolor en respuesta a estímulos por encima del umbral (hiperalgesia).

En otro caso específico, el dolor neuropático es síndrome de dolor regional complejo (CRPS). En un caso específico, el CRPS afecta a las extremidades en la ausencia de una lesión nerviosa (CRPS tipo I). En un caso más específico, dicho CRPS tipo I incluye distrofia simpática refleja (RSD). En un caso más específico, dicha RSD es RSD de estadio I, o "RSD temprana". En la RSD temprana, el dolor es más grave de lo que se experimenta a partir de la lesión, y tiene una cualidad ardiente o doliente. Se puede aumentar por la dependencia del miembro, contacto físico, o malestar emocional. El área afectada típicamente se vuelve edematosa, puede ser hipertérmica o hipotérmica, puede mostrar aumento de crecimiento de uñas y cabello. La radiografía puede mostrar cambios óseos tempranos. En otro caso más específico, la RSD es RSD de estadio II, o "RSD establecida". En un caso más específico, dicha RSD establecida comprende, además de dolor, endurecimiento de tejido edematoso; hiperhidrosis de la piel con livedo reticularis o cianosis; pérdida de cabello; formación de estrías, grietas o fragilidad de las uñas; desarrollo de manos secas; y/o atrofia apreciable de la piel y tejidos subcutáneos. El dolor sigue siendo la característica dominante. En otra realización más específica, dicha RSD es RSD de estadio III, o "RSD terminal". En un caso más específico, dicha RSD terminal comprende dolor que se extiende de forma proximal; daño tisular irreversible; piel delgada, brillante; y desmineralización ósea visible en radiografías.

En otro caso específico, el dolor neuropático es dolor causado por un fármaco, por ejemplo, un fármaco quimioterapéutico o fármaco contra el cáncer. En casos específicos, el fármaco es o comprende un fármaco que contiene platino, un taxano, una epotilona, un alcaloide vegetal, o una talidomina. En casos más específicos, el fármaco es o comprende bortezomib, carboplatino (por ejemplo, PARAPLATIN®), cisplatino (por ejemplo, PLATINOL®), citarabina (por ejemplo, CYTOSAR®, Ara-C), docetaxel (por ejemplo, TAXOTERE®), etopósido/VP-16 (VEPESID®), gemcitibina (por ejemplo, GEMZAR®), HALAVEN® (mesilato de eribulina), hexametilmelamina (por ejemplo, HEXALIN®), paclitaxel (por ejemplo, TAXOL®; ABRAXANE™), oxaliplatino (por ejemplo, ELOXATIN®), suramina, talidomida (por ejemplo, THALOMID®), vinblastina (por ejemplo, VELBAN®; ALKABAN-AQ®), vincristina (por ejemplo, ONCOVIN®, VINCASAR PFS®, Vincrex), o vinorelbina (NAVELBINE®).

En ciertos otros casos, el fármaco es un antibiótico. En ciertos otros casos, el fármaco es una estatina.

En ciertos otros casos específicos, el fármaco es o comprende amlodipina (por ejemplo, NORVASC®, Lotril o Lotrel), atorvastatina (por ejemplo, LIPITOR®), duloxetina (por ejemplo, CYMBALTA®), pregabalina (LYRICA®), allopurinol (por ejemplo, LOPURIM®, ZYLOPRIM®), aminodipinberglato, amiodarona (por ejemplo, CORDERONE®, PACERONE®), amiodipina, amitriptilina (por ejemplo, ELAVIL™, ENDEP™, VANATRIP™), metronidazol (por ejemplo, FLAGYL®, METROGEL™), nitrofurantoína (por ejemplo, FURADANTIN®, MACROBID®, MACRODANTIN®, NITRO MACRO), perhexilina, VYTORIN®, ciprofloxacina (por ejemplo, CIPRO®, PROQUIN®), disulfuram (por ejemplo, ANTABUSE), zolpidem (por ejemplo, AMBIEN®), buspirona (por ejemplo, BUSPAR),

clonazepam (por ejemplo, KLONOPIM, CEBERKLON, VALPAX), alaprazolam (por ejemplo, XANAX®), feniloína (DILANTIN®), citalopram (por ejemplo, CELEXA), duloxetina (por ejemplo, CYMBALTA®), venlaxafina (por ejemplo, EFFEXOR, EFFEXOR XR®), nortriptilina (por ejemplo, AVENTYL HCL, PAMELOR), sertralina (por ejemplo, ZOLOFT®), paroxetina (por ejemplo, PAXIL, PAXIL CR®), atenolol (por ejemplo, TENORMIN, SENORMIN), perindoprilo (por ejemplo, ACEON), altace (por ejemplo, RAMIPRIL®), losartan (por ejemplo, COZAAR®, HYZAAR®), hidralazina (por ejemplo, APRESOLINE®), hidroclorotiazida (por ejemplo, HYDRODIURIL™, EZIDE™, HYDRO-PAR™, MICROZIDE™), lisinoprilo (por ejemplo, PRINOVIL®, ZESTRIL®), telmisartan (por ejemplo, MICARDIS™), perhexilina, prazosin (por ejemplo, MINIPRESS®), lisinoprilo (por ejemplo, PRINIVIL®, ZESTRIL®), lovastatina (por ejemplo, ALTOCOR®, MEVACOR®), CADUET®, rosuvatatina (por ejemplo, CRESTOR®), fluvastatina (por ejemplo, LESCOL®, LESCOL® XL), simvastatina (por ejemplo, ZOCOR®), cerivastatina (por ejemplo, LIPOBAY™), gemfibrozilo (por ejemplo, LOPID®), pravastatina (por ejemplo, PRAVACHOL®, PRAVIGARD PAC™), d4T (estavudina, por ejemplo, ZERIT®), ddC (zalcitibina; por ejemplo, HIVID®), ddI (didanosina, por ejemplo, VIDEX® EC), isoniazida (por ejemplo, TUBIZID®), diaminodifenilsulfona (DDS, dapsona)

En ciertos casos, el dolor neuropático no es dolor causado por un fármaco, por ejemplo, un fármaco quimioterapéutico o fármaco contra el cáncer. En casos específicos, el dolor neuropático no es dolor causado por un fármaco que contiene platino, un taxano, una epotilona, un alcaloide vegetal, o una talidomida. En realizaciones más específicas, el dolor neuropático no es dolor causado por bortezomib, carboplatino (por ejemplo, PARAPLATIN®), cisplatino (por ejemplo, PLATINOL®), citarabina (por ejemplo, CYTOSAR®, Ara-C), docetaxel (por ejemplo, TAXOTERE®), etopósido/VP-16 (VEPESID®), gemcitibina (por ejemplo, GEMZAR®), HALAVEN® (mesilato de eribulina), hexametilmelamina (por ejemplo, HEXALIN®), paclitaxel (por ejemplo, TAXOL®; ABRAXANE™), oxaliplatino (por ejemplo, ELOXATIN®), suramina, talidomida (por ejemplo, THALOMID®), vinblastina (por ejemplo, VELBAN®; ALKABAN-AQ®), vincristina (por ejemplo, ONCOVIN®, VINCASAR PFS®, Vincrex), o vinorelbina (NAVELBINE®).

En otro caso específico, dicho CRPS afecta a las extremidades en presencia de una lesión nerviosa (CRPS de tipo II). En un caso más específico, dicho CRPS II incluye causalgia. En otro caso específico, dicho CRPS incluye síndrome de dolor mantenido por el sistema simpático. En ciertos casos, los síntomas del CRPS incluyen, pero sin limitación, dolor, disfunción autonómica, edema, trastorno de movimiento, distrofia, atrofia, dolor urente, alodinia (dolor con toque ligero). En ciertos casos, el dolor relacionado con CRPS está acompañado por inflamación y dolor articular, aumento de la sudoración, sensibilidad a la temperatura, y/o cambio de color de la piel.

En ciertos otros casos específicos, el dolor neuropático es dolor neuropático causado por o relacionado por una deficiencia dietética. En un caso más específico, la deficiencia dietética es deficiencia de vitamina B12 (cobalamina, cianocobalamina). En otro caso más específico, la deficiencia dietética es deficiencia de vitamina B6 (piridoxina, fosfato de piridoxal). En otro caso más específico, la deficiencia dietética es deficiencia de vitamina B1 (tiamina). En otro caso específico, el individuo que tiene dolor neuropático, causado por deficiencia nutricional, ha tenido cirugía bariátrica. En otro caso específico, el dolor neuropático es causado por o está relacionado por alcoholismo o consumo de alcohol por el individuo que tiene dolor.

En ciertos casos, el dolor es causado por o asociado con vulvodinia. La vulvodinia es dolor de la vulva, por ejemplo, dolor inexplicable por infección de la vulva o vaginal o enfermedad de la piel. En un caso, el dolor de vulvodinia se localiza en la región vulvar, por ejemplo, en la región vestibular tal como vestibulitis vulvar o vestibulodinia. En otros casos, el dolor de vulvodinia puede extenderse al clítorís, por ejemplo, clitorodinia. Los ejemplos de causas de vulvodinia incluyen, pero sin limitación, dispareunia, lesión a o irritación de los nervios que inervan la vulva, predisposición genética a la inflamación, alergia, trastornos autoinmunes (por ejemplo, lupus eritematoso o síndrome de Sjogren), infección (por ejemplo, infecciones por hongos, HPV o vaginosis bacteriana), y neuropatía. Los síntomas ejemplares de vulvodinia incluyen, sin limitación, dolor difuso o sensación de ardor en o alrededor de la vulva, los labios mayores, labios menores, o el vestíbulo.

En ciertos casos, el dolor es causado por o está asociado con cistitis intersticial. La cistitis intersticial, también conocido como síndrome de dolor vesical, es una afección crónica, a menudo caracterizada por, por ejemplo, dolor o presión asociada con la vejiga, dolor asociado con la micción, micción irritativa, frecuencia urinaria, urgencia, dolor o presión en la pelvis. La patología y patogénesis de la cistitis intersticial no se entienden con claridad. Sin embargo, se han propuesto varias causas posibles, por ejemplo, obstrucción vascular, autoinmunidad, inflamación, tejido defectuoso de la vejiga, mastocitos, estrés, y causas genéticas, neurogénicas y endocrinas. En un caso, el diagnóstico de cistitis intersticial se puede hacer por, por ejemplo, la encuesta del paciente de urgencia/frecuencia de dolor pélvico (PUF) o la prueba KCl, también conocida como la prueba de sensibilidad al potasio.

En ciertos otros casos, el dolor es dolor visceral.

En ciertos otros casos, el dolor es dolor postoperatorio, tal como el resultante de trauma al tejido causado durante una cirugía.

En ciertos otros casos, el dolor es dolor mixto, por ejemplo, es dolor crónico que tiene componentes nociceptivos y neuropáticos. En casos específicos, dicho dolor mixto es dolor por cáncer o dolor lumbar.

En ciertos otros casos, el dolor es dolor por migraña o dolor de cabeza, por ejemplo, dolor de cabeza vascular, dolor de cabeza en racimo, o dolor de cabeza tóxico.

En algunos casos, el dolor es de esclerosis sistémica o esclerodermia, por ejemplo, esclerodermia difusa o sistémica. En aún otras realizaciones, el dolor es de la enfermedad de Raynaud.

En casos específicos, dichos síntomas asociados con dolor incluyen, pero sin limitación, uno o más de disfunción autonómica, incapacidad para iniciar movimiento, debilidad, temblor, espasmo muscular, distonia, distrofia, atrofia, edema, rigidez, sensibilidad de las articulaciones, aumento en la sudoración, sensibilidad a la temperatura, tacto suave (alodinia), cambio de color en la piel, hipertemia o hipotermia, crecimiento aumentado de las uñas y el cabello, cambios óseos tempranos, hiperhidrótica con livedo reticularis o cianosis, pérdida de cabello, uñas acanaladas, agrietadas o quebradizas, manos secas, osteoporosis difusa, daño tisular irreversible, piel delgada y brillante, contracturas de las articulaciones, y desmineralización ósea marcada.

En ciertos casos, la administración de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células degenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, a un individuo de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento da como resultado una reducción del dolor en el individuo sin un efecto secundario acompañante que está asociado con uno o más fármacos indicados/usados para tratamiento del dolor, por ejemplo, gabapentina. En un caso específico el uso de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, da como resultado una reducción del dolor en un individuo al que se administran las células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo, pero no da como resultado una deficiencia de coordinación sensorial y/o motriz en dicho individuo.

Escalas de evaluación del dolor

En un caso, la cantidad terapéuticamente eficaz de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, se administra al individuo que tiene dolor en una cantidad que da como resultado una reducción detectable del dolor en el individuo. La reducción puede ser detectable para el individuo, detectable para un observador, o ambos. En ciertos casos de los métodos de tratamiento proporcionados en el presente documento, el nivel de dolor en el individuo se evalúa por el individuo, por ejemplo, guiado por un médico, o como parte de un estudio de diagnóstico de pretratamiento, de acuerdo con una o más escalas de dolor del individuo. En ciertos otros casos, el nivel de dolor en el individuo se evalúa por un observador usando una o más escalas de dolor de observador. Cuando los niveles de dolor se evalúan de acuerdo con el método antes y después de la administración de las células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo, se utiliza de manera preferente la misma escala para cada evaluación. El dolor en el individuo se puede evaluar una vez o más de una vez, por ejemplo, 2, 3, 4, o 5 veces, antes de la administración de las células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo, y una vez o más de una vez, por ejemplo, 2, 3, 4, o 5 veces, después de la administración de las células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo.

En un caso, el dolor en el individuo se evalúa por la escala numérica de intensidad del dolor de 0-10. En esta escala, el cero equivale a no sentir dolor, y el 10 equivale al peor dolor. En ciertos casos, por ejemplo, la escala de evaluación de la calidad del dolor, el dolor se divide en más de un descriptor numérico, por ejemplo, 0-10 para cómo de "caliente" se siente el dolor, 0-10 para cómo de "intenso" se siente el dolor, 0-10 para cómo de "agudo" se siente el dolor, 0-10 para cómo "sordo" se siente el dolor, 0-10 para cómo de "frío" se siente el dolor, 0-10 para cómo de "sensible" se siente el dolor, 0-10 para cómo de "tenue" se siente el dolor, 0-10 para de qué forma "pica" el dolor, 0-10 para cómo de "lacerante" se siente el dolor, 0-10 para cómo de "entumecido" se siente el dolor, 0-10 para cómo

se siente el "hormigueo" del dolor, 0-10 para cómo de "eléctrico" se siente el dolor, 0-10 para cómo de "acalambrado" se siente el dolor, 0-10 para cómo de "palpitante" se siente el dolor, 0-10 para cómo de "radiante" se siente el dolor, 0-10 para cómo de "doliente" se siente el dolor, 0-10 para cómo de "pesado" se siente el dolor, y/o 0-10 para cómo de "desagradable" se siente el dolor.

En otro caso, el dolor en el individuo se evalúa por la escala simple de intensidad de dolor descriptiva simple. En esta escala, el dolor se describe como, por ejemplo, "sin dolor", "dolor leve", "dolor moderado", "dolor grave", "dolor muy grave" o "peor dolor posible".

En otro caso, el dolor en el individuo se evalúa por la escala analógica visual. En la escala analógica visual, se le presenta al individuo un gráfico que consiste en una línea vertical; un extremo de la línea se etiqueta "sin dolor" y el otro extremo se etiqueta "peor dolor posible". Se pide al individuo que marque la línea en un punto entre los dos extremos indicando el nivel de dolor percibido por el individuo.

En otro caso, el dolor en el individuo se evalúa por la escala de clasificación de dolor Wong-Baker FACES. En la escala de clasificación de dolor FACES, el nivel de dolor se indica por una serie de caras de dibujos animados, típicamente seis caras, que aparecen felices a progresivamente más infelices. En un caso específico, los rostros tienen subtexto con frases tales como "no duele", "duele un poco", "duele un poco más", "duele incluso más", "duele mucho", y "duele muchísimo". En otro caso específico, las caras tienen subtexto con frases tales como "sin dolor", "dolor leve, molesto", "dolor persistente, incómodo, molesto", "dolor angustioso, miserable", "dolor intenso, terrible, horrible", y "dolor peor posible, inaguantable, agudísimo", ya sea en solitario o acompañadas por una escala numérica de 1 a 10.

En ciertos casos, el dolor en el individuo se evalúa por la escala FLACC (rostro, piernas, actividad, llanto y capacidad de consuelo). En casos específicos, cada una de las cinco características se clasifica de, por ejemplo, 0 a 2, indicando 2 dolor e indicando 0 sin dolor. Las puntuaciones se pueden utilizar de forma separada o se pueden totalizar.

En ciertos otros casos, el dolor en el individuo se evalúa por la escala CRIES (llanto, requiere 02 para SaO2 (saturación de hemoglobina), aumento de los signos vitales (presión sanguínea y frecuencia cardiaco, expresión e insomnio). En casos específicos, cada una de las cinco características se clasifica de, por ejemplo, 0 a 2, indicando 2 dolor e indicando 0 sin dolor. Las puntuaciones se pueden utilizar de forma separada o se pueden totalizar.

En ciertos casos, el dolor en el individuo se evalúa por la escala COMFORT, que evalúa nueve características diferentes (atención, calma, dificultad respiratoria, llanto, movimiento físico, tono muscular, tensión facial, presión sanguínea y frecuencia cardiaca), cada una clasificada en una escala de 1-5, indicando 1 sin o poco dolor, y 5 mucho dolor. Las puntuaciones se pueden utilizar de forma individual o totalizadas.

Indicios fisiológicos de dolor

Como se usa en el presente documento, "tratamiento de dolor" y similares pueden comprender la eliminación completa del dolor; reducción notable del dolor por el individuo que padece el dolor; reducción detectable de dolor o indicios de dolor por criterios objetivos (por ejemplo, frecuencia cardiaca, presión sanguínea, tono muscular, o similares); o una combinación de cualquiera de los dos o los tres. En ciertas otras realizaciones, el dolor en el individuo se puede evaluar, antes o después de la administración de células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo, o ambos, por criterios fisiológicos, por ejemplo, criterios fisiológicos de estrés. Dichos criterios fisiológicos pueden incluir criterios medibles de forma objetiva tal como frecuencia cardiaca o presión sanguínea, por ejemplo, frecuencia cardiaca o presión sanguínea elevados en comparación con un estado sin dolor en el individuo, o en comparación con una norma esperada (por ejemplo, 120 de sistólica y 80 diastólica; 60 latidos por minuto), o niveles elevados de hormonas del estrés, por ejemplo, cortisol, norepinefrina, o similares. Dichos criterios fisiológicos también pueden, o en su lugar, incluir criterios medibles de forma subjetiva tal como expresiones faciales, tensado muscular (tono muscular), sudoración, temblor, y similares.

Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo, administradas al individuo que tiene dolor, da como resultado una reducción detectable en la frecuencia cardiaca en el individuo, por ejemplo, una reducción del 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % o 50 %; una reducción de la frecuencia cardiaca de 120 latidos por minuto (bpm) o por encima a por debajo de 110 bpm; una reducción de 110 bpm o por encima a por debajo de 100 bpm; una reducción de 100 bpm o por encima a por debajo de 90 bpm; una reducción de 90 bpm o por encima a por debajo de 80 bpm; una reducción

de 120 bpm o por encima a por debajo de 100 bpm; una reducción de por encima a por debajo de 90 bpm; una reducción de 100 bpm por encima a por debajo de 80 bpm; una reducción de 130 bpm por encima a por debajo de 100 bpm; una reducción de 120 bpm por encima a por debajo de 90 bpm; una reducción de 110 bpm a por debajo de 80 bpm; o una reducción de 120 bpm o por encima a por debajo de 80 bpm.

En ciertos otros casos, la cantidad terapéuticamente eficaz de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, al administrarse al individuo que tiene dolor, da como resultado una reducción detectable de la presión sanguínea en el individuo, por ejemplo, una reducción del 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % o el 50 % de reducción en la sistólica, diastólica, o ambas, del individuo; una reducción en la sistólica del individuo de 200 o por encima a por debajo de 190; una reducción en la sistólica de 190 o por encima a por debajo de 180; una reducción en la sistólica de 180 o por encima a por debajo de 170; una reducción en la sistólica de 170 o por encima a por debajo de 160; una reducción en la sistólica de 160 o por encima a por debajo de 150; una reducción en la sistólica de 150 o por encima a por debajo de 140; una reducción en la sistólica de 140 o por encima a por debajo de 130; una reducción en la sistólica de 200 o por encima a por debajo de 180; una reducción en la sistólica de 190 o por encima a por debajo de 170; una reducción en la sistólica de 180 o por encima a por debajo de 160; una reducción en la sistólica de 170 o por encima a por debajo de 150; una reducción en la sistólica de 160 o por encima a por debajo de 140; una reducción en la sistólica de 150 o por encima a por debajo de 130; una reducción en la sistólica de 200 o por encima a por debajo de 170; una reducción en la sistólica de 190 o por encima a por debajo de 160; una reducción en la sistólica de 180 o por encima a por debajo de 150; una reducción en la sistólica de 170 o por encima a por debajo de 140; una reducción en la sistólica de 160 o por encima a por debajo de 130; una reducción en la sistólica de 200 o por encima a por debajo de 160; una reducción en la sistólica de 190 o por encima a por debajo de 150; una reducción en la sistólica de 180 o por encima a por debajo de 140; una reducción en la sistólica de 200 o por encima a por debajo de 130; una reducción en la sistólica de 200 o por encima a por debajo de 150; una reducción en la sistólica de 190 o por encima a por debajo de 140; una reducción en la sistólica de 180 o por encima a por debajo de 130; una reducción en la sistólica de 200 o por encima a por debajo de 140; una reducción en la sistólica de 190 o por encima a por debajo de 130; o una reducción en la sistólica de 200 o por encima a por debajo de 130; una reducción en la diastólica del individuo de 140 o por encima a por debajo de 130; una reducción en la diastólica de 130 o por encima a por debajo de 120; una reducción en la diastólica de 120 o por encima a por debajo de 110; una reducción en la diastólica de 110 o por encima a por debajo de 100; una reducción en la diastólica de 100 o por encima a por debajo de 90; una reducción en la diastólica de 140 o por encima a por debajo de 120; una reducción en la diastólica de 110 o por encima a por debajo de 90; una reducción en la diastólica de 140 o por encima a por debajo de 110; una reducción en la diastólica de 130 o por encima a por debajo de 100; una reducción en la diastólica de 120 o por encima a por debajo de 90; una reducción en la diastólica de 140 o por encima a por debajo de 100; una reducción en la diastólica de 130 o por encima a por debajo de 90; o una reducción en la diastólica de 140 o por encima a por debajo de 90.

En ciertos casos, la cantidad terapéuticamente eficaz de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, al administrarse al individuo que tiene dolor, da como resultado una reducción detectable en la cantidad de una o más citocinas (por ejemplo, citocinas proinflamatorias) en el individuo. En un caso específico, la administración de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, a individuos que tienen dolor de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento da como resultado una disminución en la cantidad de TNF-α, IL-2, IL-3, IL-6, IL-12, IL-17, IL-18, y/o interferón-γ, o cualquier combinación de los mismos, en el individuo. La evaluación de disminuciones en las citocinas en el individuo se puede lograr utilizando cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, los niveles de citocinas en el plasma sanguíneo del individuo se pueden medir utilizando, por ejemplo, ELISA.

En ciertos casos, la cantidad terapéuticamente eficaz de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, al administrarse al individuo que tiene dolor, da como resultado un aumento detectable en una o más citocinas en el individuo. En un caso específico, la administración de células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo al individuo que tiene dolor de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento da como resultado un aumento en la cantidad de IL-10 en el individuo. La evaluación de aumentos en los niveles de citocinas

en el individuo se puede lograr utilizando cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, los niveles de citocinas en el plasma sanguíneo del individuo se pueden medir utilizando, por ejemplo, ELISA.

En ciertos casos, la cantidad terapéuticamente eficaz de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, al administrarse al individuo que tiene dolor, da como resultado un aumento detectable en una o más hormonas de estrés en el individuo. En un caso específico, la administración de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, a un individuo que tiene dolor de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento da como resultado una disminución en la cantidad de cortisol en el individuo. Otras hormonas de estrés de ejemplo incluyen, pero sin limitación, factor de liberación de corticotropina, adrenocorticotoprina, 8-lipotropina, 3-endorfina, vasopresina, prolactina, y similares. La evaluación de la disminución en los niveles de cortisol en el individuo se puede lograr utilizando cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, los niveles de cortisol en la saliva o plasma sanguíneo o suero del individuo se pueden medir utilizando, por ejemplo, ELISA o cualquier otro método conocido por los expertos en la técnica.

En ciertos casos, la cantidad terapéuticamente eficaz de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, al administrarse al individuo que tiene dolor, da como resultado una reducción detectable en la cantidad de una o más quimiocinas en el individuo. En un caso específico, la administración de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, a un individuo que tiene dolor de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento da como resultado una disminución en la cantidad de CCL2, CCL12, y/o CXCL1, o cualquier combinación de los mismos, en el individuo. La evaluación de las quimiocinas en el individuo se puede lograr utilizando cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, los niveles de quimiocinas en el plasma sanguíneo del individuo se pueden medir utilizando, por ejemplo, ELISA o cualquier otro método conocido por los expertos en la técnica.

En ciertos casos, la cantidad terapéuticamente eficaz de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, al administrarse al individuo que tiene dolor, da como resultado una reducción detectable en la activación y/o la diferenciación en uno o más tipos de células en el individuo. En un caso específico, la administración de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, a un individuo que tiene dolor de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento da como resultado una disminución en la activación y/o diferenciación de células dendríticas, linfocitos T, y/o macrófagos, o cualquier combinación de los mismos, en el individuo. La evaluación de la activación y/o diferenciación de tipos de células específicas en el individuo se puede lograr utilizando cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, medición de marcadores de células específicas presentes en áreas específicas del individuo, por ejemplo, medición/evaluación de marcadores de células específicas asociados con células de la sangre, o asociados con células encontradas en tejidos/órganos específicos.

Supresión de una respuesta inflamatoria asociada con, o causante de, dolor

La inflamación no es una fuente exclusiva de dolor. Sin embargo, en ciertos casos, las células madre y regenerativas de tejido adiposo se pueden utilizar para mejorar el dolor relacionado con, o causado por, inflamación. En un caso, se proporciona en el presente documento un método para la mejora del dolor en un individuo que comprende poner en contacto una o más células inmunes en el individuo con una cantidad eficaz de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas tejido adiposo que comprenden células madre y células regenerativas, y similares, en el que dicha cantidad eficaz es una cantidad que (1) suprime de forma detectable una respuesta inmune en dicho individuo, y (2) reduce de forma detectable el dolor en dicho individuo. En casos específicos, dichas células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo suprimen de forma detectable la

proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción linfocitaria mixta (MLR) o en un ensayo de regresión. El contacto puede realizarse, por ejemplo, administrando las células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, al individuo, por ejemplo, por vía local, sistémica o regional (o por una combinación de estas). Por lo tanto, se describe en el presente documento un método para la mejora del dolor en un individuo que comprende poner en contacto una o más células inmunes en el individuo con una cantidad eficaz de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas tejido adiposo que comprenden células madre y células regenerativas, y similares, en el que dicha cantidad eficaz es una cantidad que (1) modula de forma detectable, por ejemplo, suprime, una respuesta inmune y/o inflamatoria en dicho individuo, y (2) reduce de forma detectable el dolor en dicho individuo. En un caso específico, el contacto de una o más células inmunes en el individuo con una cantidad eficaz de células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo da como resultado un descenso en la cantidad de TNF-α, IL-2, IL-3, IL-6, IL-12, IL-17, IL-18, y/o interferón-γ, o cualquier combinación de los mismos, en el individuo. En otro caso específico, el contacto de una o más células inmunes en el individuo con una cantidad eficaz de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, da como resultado una disminución de la cantidad de CCL2, CCL12, y/o CXCL1, o cualquier combinación de los mismos, en el individuo. En otro caso específico, el contacto de una o más células inmunes en el individuo con una cantidad eficaz de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, da como resultado un aumento de la cantidad de IL-10 en el individuo.

En otro caso, se describe en el presente documento un método para la mejora del dolor en un individuo que comprende administrar una cantidad eficaz de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, al individuo, en el que dicha cantidad eficaz es una cantidad que (1) modula de forma detectable, por ejemplo, suprime, una respuesta inmune y/o inflamatoria en dicho individuo, y (2) reduce de forma detectable el dolor en dicho individuo. En casos específicos, dichas células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, suprimen de forma detectable la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción linfocitaria mixta (MLR) o un ensayo de regresión. La administración se puede realizar de forma local, de forma sistémica, o de forma regional (o mediante una combinación de éstas). En un caso específico, la administración de una cantidad eficaz de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, a los individuos da como resultado una disminución en la cantidad de TNF-α, IL-2, IL-3, IL-6, IL-12, IL-17, IL-18, y/o interferón-γ, o cualquier combinación de los mismos, en el individuo. En otro caso específico, la administración de una cantidad eficaz de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, al individuo da como resultado una disminución de la cantidad de CCL2, CCL12, y/o CXCL1, o cualquier combinación de los mismos, en el individuo. En otro caso específico, la administración de una cantidad eficaz de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, al individuo da como resultado un aumento en la cantidad de IL-10 en el individuo.

Una "célula inmune" en el contexto de este método se refiere a cualquier célula del sistema inmune (adaptativa o innata), particularmente linfocitos T y células NK (asesinas naturales), células dendríticas, y macrófagos. Por lo tanto, en diversas realizaciones del método, las células madre y regenerativas de tejido adiposo se ponen en contacto con una pluralidad de células inmunes, en el que la pluralidad de células inmunes son, o comprenden, una pluralidad de linfocitos T (por ejemplo, una pluralidad de linfocitos T CD3+, linfocitos T CD4+ y/o linfocitos T CD8+) y/o células asesinas naturales. Una "respuesta inmune" en el contexto del método puede ser cualquier respuesta por una célula inmune a un estímulo normalmente percibido por una célula inmune, por ejemplo, una respuesta a la presencia de un antígeno. En diversos casos, una respuesta inmune puede ser la proliferación de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T CD3+, linfocitos T CD4+, y/o linfocitos T CD8+) en respuesta a un antígeno extraño, tal como un

antígeno presente en una transfusión o injerto, o a un auto-antígeno, como en una enfermedad autoinmune. La respuesta inmune también puede ser una proliferación de linfocitos T contenidos dentro de un injerto. La respuesta inmune también puede ser cualquier actividad de una célula asesina natural (NK), la maduración de una célula dendrítica, la diferenciación de linfocitos T, la desviación de macrófagos en el linaje M1 o M2, o similares.

Las células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, utilizadas para reducción o mejora del dolor, por ejemplo, mediante la reducción de inflamación, también se pueden derivar de una única especie, por ejemplo, las especies del receptor indicado o las especies de las células inmunes cuya función se va a reducir o suprimir, o se pueden derivar de múltiples especies.

En diversos casos, dicho contacto o administración de las células derivadas de tejido adiposo es suficiente para suprimir una función inmune (por ejemplo, proliferación de linfocitos T en respuesta a un antígeno) o inflamación en un individuo afligido con dolor en al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o 95 %, en comparación con la función inmune en ausencia de las células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares. Dicha supresión en un contexto *in vivo* se puede determinar en un ensayo *in vitro* (véase más adelante) usando, por ejemplo, una muestra de linfocitos T del individuo; es decir, el grado de supresión en el ensayo *in vitro* se puede extrapolar, para un número particular de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, y varias células inmunes en un individuo receptor, a un grado de supresión en el individuo.

Las células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo se pueden ensayar, por ejemplo, en una MLR que comprende combinar linfocitos T CD4+ o CD8+, células dendríticas (DC) y células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo en una relación de aproximadamente 10:1:2, donde los linfocitos T se tiñen con un colorante tal como, por ejemplo, CFSE que se divide en células hijas, y en donde se permite que los linfocitos T proliferen durante aproximadamente 6 días. Los linfocitos T y/o células DC se pueden obtener a partir del individuo que se va a tratar, por ejemplo, pueden ser autólogas para el individuo, o pueden ser alogénicas para el individuo. Las células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, son inmunosupresoras si la proliferación de linfocitos T en 6 días en presencia de células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo se reduce de forma detectable en comparación con la proliferación de linfocitos T en presencia de células DC y en la ausencia de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares. En un caso de una MLR, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, se pueden descongelar o recolectar del cultivo. Aproximadamente 20.000 células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo se resuspenden en 100 µl de medio (RPMI 1640, tampón HEPES 1 mM, antibiótico, y suero humano combinado al 5 %), y se dejó que se unieran al fondo de un pocillo durante 2 horas. Se aíslan linfocitos T CD4+ y/o CD8+ de la totalidad de las células mononucleares sanguíneas periféricas mediante perlas magnéticas Miltenyi. Las células se tiñen con CFSE, y se añaden por pocillo un total de 100.000 linfocitos T (linfocitos T CD4+ en solitario, linfocitos T CD8+ en solitario, o cantidades equivalentes de linfocitos T CD4+ y CD8+). El volumen en el pocillo se lleva a 200 µl, y se deja avanzar la MLR.

En ciertos casos, la actividad antiinflamatoria (es decir, la actividad inmunosupresora) de las células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, se determina antes de la administración al individuo que padece dolor. Esto puede realizarse, por ejemplo, determinando la actividad inmunosupresora de una muestra de las células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, a administrar para la mejora del dolor. Tal actividad puede determinarse, por ejemplo, ensayando una muestra de las células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden

células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, por ejemplo, en una MLR o un ensayo de regresión. En un caso, una MLR se realiza con la muestra, y se determina un grado de inmunosupresión demostrado por las células derivadas de tejido adiposo de muestra, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, en el ensayo. Se espera que grado de mejora del dolor se correlacione con la actividad inmunosupresora de las células derivadas de tejido adiposo muestreadas, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares. Por lo tanto, la MLR es un método ejemplar que puede usarse en los ejemplos divulgados en el presente documento, como un método para determinar la capacidad absoluta y relativa de una población particular de células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo o células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, para mejorar el dolor atribuible a la inflamación.

Los parámetros de la MLR pueden variarse para proporcionar más datos o para determinar mejor la capacidad de una muestra de células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo o células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo para inmunosuprimir y, por lo tanto, mejorar el dolor. Por ejemplo, dado que la inmunosupresión por las células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo parece aumentar aproximadamente en proporción al número de células de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, presentes en el ensayo, la MLR puede realizarse, en un caso, con dos o más números de células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, 1×10^3, 3×10^3, 1×10^4 y/o 3×10^4 células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, por reacción. El número de células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo con respecto al número de linfocitos T en el ensayo también puede variarse. Por ejemplo, las células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo y linfocitos T en el ensayo pueden estar presentes en cualquier relación, por ejemplo, de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:10, preferiblemente aproximadamente 1:5, aunque puede usarse un número relativamente mayor de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, o linfocitos T.

El ensayo de regresión o ensayo BTR puede usarse de manera similar.

En algunos casos, la inmunosupresión y/o inmunomodulación en un sujeto puede determinarse ensayando el nivel de diversas citocinas, células inmunes, y similares, como se describe en el presente documento, antes y después de la administración de las células derivadas de tejido adiposo al sujeto.

Las células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, pueden administrarse a un individuo en una relación, con respecto a un número conocido o esperado de células inmunes, por ejemplo, linfocitos T, en el individuo, o de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:10, preferiblemente aproximadamente 1:5. Sin embargo, las células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, pueden administrarse a un individuo en una relación, en ejemplo no limitantes, de aproximadamente 10.000:1, aproximadamente 1.000:1, aproximadamente 100:1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 1:1, aproximadamente 1:10, aproximadamente 1:100, aproximadamente 1:1.000 o aproximadamente 1:10.000. En general, de aproximadamente 1×10^5 a aproximadamente 1×10^8 células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, por kilogramo del receptor, preferiblemente de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^7 células por kilogramo de receptor pueden administrarse para realizar la inmunosupresión. Por ejemplo, en diversos caos, se administran de aproximadamente 1×10^5 a aproximadamente 1×10^8 células madre derivadas de tejido adiposo por kilogramo de receptor para la

inmunosupresión. En diversos casos, se administran de aproximadamente 1 x 10^5 a aproximadamente 1 x 10^8 células regenerativas derivadas de tejido adiposo por kilogramo de receptor para la inmunosupresión. Por ejemplo, en diversos caos, se administran de aproximadamente 1 x 10^5 a aproximadamente 1 x 10^8 células progenitoras derivadas de tejido adiposo por kilogramo de receptor para la inmunosupresión. En diversos casos, las células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, administradas a un individuo o sujeto comprenden al menos, aproximadamente, o no más de, 1 x 10^5, 3 x 10^5, 1 x 10^6, 3 x 10^6, 1 x 10^7, 3 x 10^7, 1 x 10^8, 3 x 10^8, 1 x 10^9, 3 x 10^9 células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, o más.

Las células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, también pueden administrarse con uno o más segundos tipos de células madre o estromales, por ejemplo, células madre mesenquimales o células estromales mesenquimales procedentes de médula ósea, cordón umbilical, músculo, pulpa dental, amnios, y similares. Dichas segundas células madre pueden administrarse a un individuo con dichas células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, en una relación de, por ejemplo, entre aproximadamente 1:10 a aproximadamente 10:1.

Para facilitar el contacto, o proximidad, de las células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, y células inmunes *in vivo,* las células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, pueden administrarse a un individuo por cualquier ruta suficiente para poner las células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, y células inmunes en contacto entre sí. Por ejemplo, las células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo se pueden administrar al individuo, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraocular, parenteral, intratecal, subcutánea, en el sistema linfático (por ejemplo, en un vaso linfático o nodo linfático) o directamente en un órgano, por ejemplo, dedos, páncreas, y similares. Las células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, se pueden administrar a un área del individuo que padece dolor en el sitio del dolor, o en un sitio de daño en el nervio que causa el dolor. Para administración *in vivo*, las células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, se pueden formular como una composición farmacéutica, como se describe más adelante.

También se describe en el presente documento la administración a un individuo que padece dolor de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, que se han diseñado genéticamente para expresar una o más citocinas antiinflamatorias. En un caso específico, dichas citocinas antiinflamatorias comprenden un antagonista del receptor IL-10, IL)-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-13, o cualquier combinación de los mismos.

Segundas composiciones terapéuticas y segundas terapias

En cualquiera de los métodos descritos anteriores de tratamiento del dolor en un individuo, el método puede comprender la administración de una segunda composición terapéutica o segunda terapia, por ejemplo, una medicación o terapia contra el dolor. En un caso preferido, los segundos agentes activos son capaces de aliviar el dolor, inhibir o modular reacciones inflamatorias, proporcionar un efecto sedante o un efecto antialérgico, o asegurar la comodidad del paciente.

En ciertos casos, las segundas composiciones terapéuticas comprenden, pero sin limitación, analgésicos opioides, analgésicos no narcóticos, antiinflamatorios, inhibidores de cox-2, agonistas o antagonistas del receptor alfa-adrenérgico, ketamina, agentes anestésicos, antagonistas de NMDA, agentes inmunomoduladores, agentes inmunosupresivos, antidepresivos, anticonvulsivantes, anti-hipertensivos, ansiolíticos, bloqueadores de canales de calcio, relajantes musculares, corticosteroides, oxígeno hiperbárico, inhibidores de JNK, otros agentes terapéuticos conocidos para aliviar el dolor, y sales farmacéuticamente aceptables, solvatos, hidratos, estereoisómeros, clatratos, profármacos y metabolitos farmacéuticamente activos de los mismos.

En ciertos casos, la segunda composición terapéutica es un opioide. Los opioides pueden usarse, por ejemplo, para tratar el dolor grave. Los ejemplos de analgésicos opioides incluyen, pero sin limitación, oxicodona (por ejemplo, OXYCONTIN®), sulfato de morfina (por ejemplo, MS CONTIN®, DURAMORPH®, y/o ASTRAMORPH®), meperidina (por ejemplo, DEMEROL®), y parche transdérmico de fentanilo (por ejemplo, DURAGESIC®) y otros medicamentos convencionales conocidos. La oxicodona (por ejemplo, OXYCONTIN®) es una forma de acción prolongada de un opioide y puede usarse, por ejemplo, en fases iniciales y tardías de CRPS.

Los analgésicos y antiinflamatorios no narcóticos se pueden utilizar, por ejemplo, para tratamiento del dolor durante el embarazo y la lactancia. Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) se puede utilizar, por ejemplo, en la fase temprana del síndrome de dolor. Los ejemplos de antiinflamatorios incluyen, pero sin limitación, acetato de ácido salicílico (por ejemplo, aspirina), ibuprofeno (por ejemplo, MOTRIN®, ADVIL®, o similares), ketoprofeno (por ejemplo, ORUVAIL®), rofecoxib (por ejemplo, VIOXX®), naproxeno sódico (por ejemplo, ANAPROX®, NAPRELAN®, NAPROSYN®, o similares), ketorolac (por ejemplo, ACULAR®), u otros medicamentos convencionales conocidos. Un inhibidor de cox-2 específico es celecoxib (por ejemplo, CELEBREX).

Los ejemplos de segundos compuestos terapéuticos que son antidepresivos incluyen, pero sin limitación, nortriptilina (PAMELOR®), amitriptilina (ELAVIL®), imipramina (TOFRANIL®), doxepina (SINEQUANO), clomipramina (ANAFRANIL®), fluoxetina (PROZAC®), sertralina (ZOLOFT®), nefazodona (SERZONE®), venlafaxina (EFFEXOR®), trazodona (DESYREL®), bupropión (WELLBUTRIN®) y otros medicamentos convencionales conocidos. Véase, por ejemplo, Physicians' Desk Reference, 329, 1417, 1831 y 3270 (57ª ed., 2003).

Los ejemplos de segundos compuestos terapéuticos que son fármacos anticonvulsivos incluyen, pero sin limitacion, carbamazepina, oxcarbazepina, gabapentina (NEURONTIN®), feniloína, valproato sódico, clonazepam, topiramato, lamotrigina, zonisamida, y tiagabina. Véase, por ejemplo, Physicians' Desk Reference, 2563 (57ª ed., 2003).

Otros segundos compuestos terapéuticos útiles en los casos descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, corticosteroides (por ejemplo, prednisona, dexametasona o hidrocortisona), agentes antiarrítmicos de clase Ib activos por vía oral (por ejemplo, mexiletina), bloqueadores del canal de calcio (por ejemplo, nifedipina), beta bloqueadores (por ejemplo, propanolol), bloqueador alfa (por ejemplo, fenoxibenzamina), y agonistas alfa2-adrenérgicos (por ejemplo, clonidina) también se pueden utilizar en combinación con un compuesto inmunomodulador. Véase, por ejemplo, Physicians' Desk Reference, 1979, 2006 y 2190 (57ª ed., 2003).

Se puede administrar cualquier combinación de los agentes terapéuticos anteriores. Dichos agentes terapéuticos se pueden administrar en cualquier combinación con las células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo, al mismo tiempo o como un ciclo de tratamiento separado.

En algunos casos, el segundo agente terapéutico se administra de forma concomitante con las células derivadas de tejido adiposo (por ejemplo, en una sola composición, o en diferentes composiciones administradas al mismo tiempo. En algunos casos, el segundo agente terapéutico se administra antes de, o posterior a, la administración de las células derivadas de tejido adiposo. Preferiblemente, el segundo agente terapéutico se administra en un periodo de 24 horas de las células derivadas de tejido adiposo.

Se debe señalar que algunos de los segundos compuestos terapéuticos enumerados anteriormente (por ejemplo, fluoxetina), a pesar de tener un efecto beneficioso, pueden por sí mismos como un efecto secundario causar dolor neuropático en un pequeño número de receptores. Generalmente, dichos componentes se consideran seguros para administrar; sin embargo, un experto en la técnica (por ejemplo, un médico) será capaz de determinar el beneficio relativo de la administración de este segundo compuesto terapéutico en comparación con el riesgo de dolor neuropático adicional.

Las células derivadas de tejido adiposo descritas en el presente documento, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas,

células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, se pueden administrar al individuo que padece de dolor en la forma de una composición farmacéutica, por ejemplo, una composición farmacéutica adecuada para inyección intravenosa, intramuscular o intraperitoneal. Las células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, se pueden administrar al individuo en una única dosis, o en múltiples dosis. Cuando las células, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, se administran en múltiples dosis, las dosis pueden ser parte de un régimen terapéutico diseñado para aliviar el dolor, o pueden ser parte de un régimen terapéutico de largo plazo diseñado para tratar la causa subyacente del dolor. En casos en los que las células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, se administran con un segundo agente terapéutico, o con un segundo tipo de células madre, las células derivadas de tejido adiposo y el segundo agente terapéutico y/o segundo tipo de células madre se pueden administrar al mismo tiempo (por ejemplo, como una única composición, o en composiciones separadas) o en diferentes momentos, por ejemplo, las administraciones pueden tener lugar en un periodo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 10, 20, 30, 40, o 50 minutos entre sí, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, o 22 horas entre sí, o en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 8, 9 o 10 días o más entre sí.

Esclerodermia

La esclerodermia es una enfermedad reumática autoinmune asociada con fibrosis y dolor crónico. Se clasifica como esclerodermia localizada o esclerodermia sistémica. La esclerodermia localizada se subclasifica como morfea (parches cerosos en la piel de tamaños variables) o esclerodermia lineal (una raya o línea de piel cerosa, endurecida en un brazo o pierna o sobre la frente, que puede conducir a anomalías en las articulaciones); mientras la esclerodermia sistémica se clasifica como limitada (síndrome CREST - calcinosis, fenómeno de Raynaud, disfunción esofágica, esclerodactilia y telangectasia) o difusa (el engrosamiento de la piel se presenta de forma más rápida e implica más áreas de la piel que en la enfermedad limitada y un mayor riesgo de desarrollar "esclerosis" o endurecimiento fibroso de los órganos internos). Estas son categorías amplias que incluyen muchas manifestaciones diferentes.

Lo más significativo es que tanto la esclerodermia limitada como difusa puede estar acompañada con hipertensión pulmonar, una afección en la que los vasos sanguíneos de los pulmones se estrechan, conduciendo a flujo sanguíneo disminuido a través de los pulmones que da como resultado falta de aliento, así como, fibrosis pulmonar. La inflamación en los vasos sanguíneos del cuerpo conduce a su estrechamiento. El daño adicional a partir de la inflamación y el impacto de la presión sanguínea aumentada puede conducir a la destrucción de arterias más pequeñas. Como resultado, tiene lugar la fibrosis. Este proceso puede tener consecuencias devastadoras y el corazón y los pulmones pueden sufrir una pérdida significativa de eficiencia. La hipertensión arterial pulmonar (PAH) es la causa principal de muerte en pacientes con esclerodermia.

La esclerodermia sistémica es una forma de esclerodermia, que carece de cambios en la piel pero tiene manifestaciones sistémicas. Las formas sistémicas de esclerodermia pueden causar problemas cardiacos (corazón). La esclerodermia sistémica puede causar arritmias, derrame pericárdico, cicatrización, disfunción ventricular izquierda y derecha, isquemia miocárdica, remodelación cardiaca, e insuficiencia cardiaca.

Las complicaciones graves de la esclerodermia incluyen:

Corazón: La alta presión sanguínea sin tratar fuerza el corazón; la frecuencia cardiaca irregular y el agrandamiento del corazón conducen a insuficiencia cardiaca.
Riñón: La crisis renal de esclerodermia en la que se desarrolla hipertensión maligna y provoca insuficiencia renal aguda.
Pulmón: Dos tercios de todos los pacientes padecen problemas respiratorios, tal como falta de aliento, tos, dificultad para respirar, alveolitis (inflamación de los alveolos pulmonares), neumonía, y cáncer.
Sistema digestivo: Daño del esófago, reflujo ácido, ectasia vascular antral gástrica (GAVE), que ocasionalmente pueden sangrar profusamente.
Piel y articulaciones: Síndrome del túnel carpiano, dolor de articulaciones, y rigidez.
Boca: Parches blancos planas, pérdida de mucosa gingival unida, recesión gingival, y ensanchamiento difuso del espacio del ligamento periodontal (PDL). La disfagia puede resultar de la deposición de colágeno

en la submucosa lingual y esofágica. La reabsorción de la rama posterior de la mandíbula, el proceso de coronoides, y el cóndilo. Inelasticidad de la boca.

Varias afecciones diferentes están asociadas con el desarrollo de fibrosis. Los ejemplos de estas afección son: fibrosis sistémica y/o local secundaria al tratamiento con agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, bleomicina o similares) o radioterapia, fibrosis secundaria al trauma (por ejemplo, quemadura, trauma accidental, incisión o intervención quirúrgica, o similares). La fibrosis está asociada con dichas afecciones conduce frecuentemente a una función reducida del área afectada: por ejemplo, intervalo reducido de movimiento de una articulación o superficie de la piel, curación disminuida, elasticidad reducida. En algunos casos esto se puede tratar mediante resección invasiva del tejido de cicatriz y el injerto en el tejido normal (tal como un injerto de piel de espesor escindido) o mediante otros procedimientos quirúrgicos que liberan la cicatriz y adherencias asociadas del tejido adyacente. La fibrosis secundaria y la recurrencia del déficit funcional y el dolor es común después de estos enfoques. Por lo tanto, existe una necesidad sustancial de un enfoque mejorado tanto en términos de un enfoque que sea menos invasivo como en términos de eficacia.

En algunos casos, las células derivadas de tejido adiposo divulgadas en el presente documento mejoran la fibrosis en los pulmones, corazón, riñón, y articulaciones en sujetos con esclerodermia difusa. En algunos casos, las células derivadas de tejido adiposo divulgadas en el presente documento mejoran o tratan los síntomas asociados con esclerodermia limitada.

En algunos casos, los métodos de tratamiento o prevención de esclerodermia o esclerosis sistémica divulgados en el presente documento comprenden la administración de células derivadas de tejido adiposo en múltiples dosis. En algunas realizaciones, los métodos de tratamiento o prevención de esclerodermia o esclerosis sistémica divulgados en el presente documento comprenden la administración de múltiples dosis de células derivadas de tejido adiposo durante un periodo de tiempo, por ejemplo, cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más días, cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 meses, cada 1,5 años, cada 2 años, o cualquier cantidad de tiempo entremedio.

En algunas realizaciones, el tratamiento con células derivadas de tejido adiposo como se divulga en el presente documento da como resultado una mejora significativa en la puntuación de Cochin, por ejemplo, más del 5 %, más del 10 %, más del 20 %, más del 30 %, más del 40 %, o más del 50 %, desde el inicio (antes de la administración de las células derivadas de tejido adiposo), al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, al menos 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses, al menos un año, o más, después de la administración de células derivadas de tejido adiposo como se describe en el presente documento al sujeto.

En algunas realizaciones, el tratamiento con células derivadas de tejido adiposo como se divulga en el presente documento da como resultado una mejora significativa en la puntuación VAS del dolor, por ejemplo, más del 5 %, más del 10 %, más del 20 %, más del 30 %, más del 40 %, o más del 50 %, desde el inicio (antes de la administración de las células derivadas de tejido adiposo), al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, al menos 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses, al menos un año, o más, después de la administración de células derivadas de tejido adiposo como se describe en el presente documento al sujeto.

En algunas realizaciones, el tratamiento con células derivadas de tejido adiposo como se divulga en el presente documento da como resultado una mejora significativa en la puntuación SHAQ (cuestionario de evaluación de salud de esclerodermia), por ejemplo, más del 5 %, más del 10 %, más del 20 %, más del 30 %, más del 40 %, o más del 50 %, desde el inicio (antes de la administración de las células derivadas de tejido adiposo), al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, al menos 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses, al menos un año, o más, después de la administración de células derivadas de tejido adiposo como se describe en el presente documento al sujeto.

En algunas realizaciones, el tratamiento con células derivadas de tejido adiposo como se divulga en el presente documento da como resultado una mejora significativa en la puntuación cutánea Rodnan, por ejemplo, más del 5 %, más del 10 %, más del 20 %, más del 30 %, más del 40 %, o más del 50 %, desde el inicio (antes de la administración de las células derivadas de tejido adiposo), al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, al menos 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses, al menos un año, o más, después de la administración de células derivadas de tejido adiposo como se describe en el presente documento al sujeto.

En algunas realizaciones, el tratamiento con células derivadas de tejido adiposo como se divulga en el presente documento da como resultado una disminución significativa en el número de megacapilares en el lecho ungueal de los sujetos, por ejemplo, más del 5 %, más del 10 %, más del 20 %, más del 30 %, más del 40 %, o más del 50 %, desde el inicio (antes de la administración de las células derivadas de tejido adiposo), al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, al menos 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses, al menos un año, o más, después de la administración de células derivadas de tejido adiposo como se describe en el presente documento al sujeto.

Fenómeno de Raynaud

El fenómeno de Raynaud está caracterizado por flujo sanguíneo excesivamente reducido en respuesta a estrés emocional o frío, que provoca decoloración de los dedos, los dedos del pie, y ocasionalmente otras áreas. Esta afección también puede hacer que las uñas se vuelvan quebradizas con arrugas longitudinales. El síndrome de Raynaud surge como el resultado de espasmos vasculares que disminuyen el suministro de sangre a las regiones respectivas. El fenómeno de Raynaud por sí mismo es sólo un signo (hipoperfusión) acompañado por un síntoma (incomodidad). Al vincularse con la patogénesis, puede ser parte de la enfermedad de Raynaud (también conocido como fenómeno de Raynaud primario), donde la causa es desconocida, o parte del síndrome de Raynaud (fenómeno de Raynaud secundario), que es un síndrome causado por una enfermedad primaria conocida, trastornos del tejido conectivo más comunes tal como lupus eritematoso sistémico.

Las terapias actuales para el fenómeno de Raynaud requieren (i) medicación profiláctica diaria de forma oral o intravenosa, por ejemplo con un bloqueador del canal de calcio o betabloqueante, lo que es indeseable debido a los efectos secundarios y a largo plazo (por ejemplo hipertensión postural), o (ii) son lentos y poco fiables para el tratamiento de síntomas conforme se presentan (de forma aguda). Por consiguiente, existe una necesidad de tratamientos en el fenómeno de Raynaud.

Se conocen diversas causas del fenómeno Raynaud secundario e incluyen, por ejemplo trastornos del tejido conectivo tal como esclerodermia, lupus sistémico eritematoso, artritis reumatoide, síndrome de Sjógren, dermatomiositis, polimiositis, enfermedad mixta del tejido conectivo, enfermedad por crioaglutininas, síndrome de Ehlers-Danlos, y similares. Trastornos de la alimentación tal como anorexia nerviosa también pueden dar lugar al fenómeno de Raynaud. Los trastornos obstructivos, tales como arteroclerosis, enfermedad de Buerger, arteritis de Takayasu, aneurisma subclavia, síndrome de la salida torácica, y similares también pueden causar el fenómeno de Raynaud. Los fármacos tal como los betabloqueantes, agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, bleomicina y similares), ciclosporina, bromocriptina, ergotamina, sulfasalazina, medicamentos estimulantes (por ejemplo, medicamentos utilizados en el tratamiento de ADHD), vacunas contra el ántrax, y similares, también pueden dar lugar al fenómeno de Raynaud. El trauma físico, tal como el sustentado en accidentes automovilísticos u otros eventos traumáticos, enfermedad de Lyme, hipotiroidismo, crioglobulinemia, neoplasia, síndrome de fatiga crónica, distrofia simpática refleja, síndrome del túnel carpiano, deficiencia de magnesio, esclerosis múltiple, y eritromelalgia (lo opuesto al fenómeno de Raynaud, con extremidades calientes y tibias) que a menudo co-existen en pacientes con Raynaud también se sabe que dan lugar al fenómeno de Raynaud. Las células derivadas de tejido adiposo divulgadas en el presente documento (por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y células precursoras, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y otras células regenerativas, y similares), son útiles en el tratamiento del fenómeno de Raynaud que surge a partir de cualquiera de uno o más de los anteriores. Como tal, las células descritas en el presente documento, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, pueden tratar o prevenir el síndrome de Raynaud primario o secundario.

Se pueden usarse diferentes pruebas conocidas en la técnica para diagnosticar el fenómeno de Raynaud. Mientras que el experto en la técnica apreciará fácilmente que las pruebas desarrolladas en el futuro para el diagnóstico de la enfermedad de Raynaud también son útiles en los casos descritos en el presente documento, los ejemplos no limitantes de pruebas útiles en el diagnóstico de la enfermedad de Raynaud en los casos divulgados en el presente documento incluyen:

(1) Presión arterial digital: se miden presiones en las arterias de los dedos antes y después de que se hayan enfriado las manos. Se diagnostica una disminución de al menos 15 mmHg (positiva).
(2) Ultrasonido Doppler: para evaluar el flujo sanguíneo.

(3) Hemograma completo: éste puede revelar una anemia normocítica que sugiere la anemia de enfermedad crónica o insuficiencia renal.
(3) Prueba sanguínea para urea y electrolitos: esto puede revelar insuficiencia renal.
(4) Pruebas de función tiroidea: esto puede revelar hipotiroidismo.
(5) Un tamiz de auto-anticuerpos, pruebas para factor reumatoide, velocidad de sedimentación globular, y proteína C-reactiva, que puede revelar enfermedades causales específicas o un proceso inflamatorio generalizado.
(6) Vasculatura del lecho ungueal: Se puede examinar bajo el microscopio.

La célula derivada de tejido adiposo puede tratar o prevenir uno o más síntomas del fenómeno de Raynaud (ya sea primario o secundario), por ejemplo, incluyendo, pero sin limitación, los descritos en el presente documento y utilizando los métodos de diagnóstico divulgados en el presente documento, e incluyendo, pero sin limitación, la prevención o reducción de la extensión de la vasoconstricción que se presenta cuando un sujeto con fenómeno de Raynaud está expuesto a estrés o frío; y la reversión o disminución de la vasoconstricción inducida por el frío o inducida por el estrés de la circulación arterial cutánea.

Métodos para tratar la fibrosis

La fibrosis es una afección caracterizada por una deposición de componentes de matriz extracelular en los órganos internos, incluyendo los riñones, corazón, pulmones, hígado, y articulaciones.

La fibrosis pulmonar es una de las enfermedades fibróticas predominantes. La fibrosis pulmonar idiopática (IPF) está caracterizada por inflamación crónica de las paredes alveolares con fibrosis progresiva, de etiología desconocida. La IPF, o alveolitis fibrosante criptogénica, provoca del 50 al 60 % de casos de enfermedad pulmonar intersticial idiopática (para revisiones sobre IPF, véase Khalil N y O'Connor 2004 y Selman et al. 2004).

La neumonía intersticial usual (UIP), un patrón histopatológico específico de la neumonía intersticial, es el patrón clásico encontrado en la biopsia pulmonar en IPF. A bajo aumento, el tejido parece heterogéneo, con las áreas alternas de pulmón normal, inflamación intersticial, fibrosis, y en panal de abejas. La inflamación intersticial consiste en un infiltrado alveolar septal de linfocitos, células plasmáticas, e histocitos asociados con hiperplasia de neumocitos tipo II. Las zonas fibróticas están compuestas principalmente por colágeno acelular denso, aunque focos dispersos de los fibroblastos proliferantes (focos fibroblásticos), que son los sitios de enfermedad temprana y activa, también se pueden ver, por lo general en una ubicación intra-alveolar. Las áreas de panal de abeja están compuestas por espacios aéreos fibróticos quísticos, frecuentemente forradas con epitelio bronquial y rellenas de mucosidad. Los neutrófilos pueden acumularse en la mucosidad. La hiperplasia del músculo liso a menudo se presenta en áreas de fibrosis y de panal de abeja. La distribución subpleural y paraseptal, carácter irregular, y heterogeneidad temporal son las características más útiles para identificar la UIP.

Un patrón idéntico de inflamación intersticial y fibrosis se presenta en trastornos vasculares de colágeno (por ejemplo, RA, SLE, esclerosis sistémica progresiva, enfermedad mixta del tejido conectivo, diabetes mellitus) pneumoconiosis (por ejemplo, asbestosis), lesión por radiación, y ciertas enfermedades pulmonares inducidas por fármacos (por ejemplo, por nitrofurantoína).

El ciclo clínico de IPF es progresivo, la supervivencia media es de 4 a 6 años después del diagnóstico. La prednisona es el tratamiento habitual en caso de IPF. La respuesta al tratamiento es variable, pero los pacientes con enfermedad temprana, en una etapa más celular antes de que predomine la cicatrización, parece que es más probable que mejoren con terapia con corticosteroides o citotóxica. El tratamiento de apoyo y paliativo incluye O_2 en altas concentraciones para aliviar la hipoxemia y, si se presenta infección bacteriana, antibióticos. El trasplante de pulmón ha sido exitoso en pacientes con enfermedad pulmonar de estadio terminal. La fibrosis del hígado se refiere a una acumulación en el hígado de tejido conectivo resultante a partir de un desequilibrio entre la producción y degradación de la matriz extracelular y acentuado por el colapso y condensación de fibras preexistentes (para revisiones, véase Afdhal NH y Nunes D, 2004. Kershenobich y Weissbrod. 2003. Pinzani y Rombouts 2004).

La fibrosis hepática es una respuesta común a lesión o necrosis hepatocelular, que puede estar inducida por una amplia diversidad de agentes, por ejemplo, cualquier proceso que interrumpe la homeostasis hepática (especialmente inflamación, lesión toxica, diabetes, esteatohepatitis, o flujo sanguíneo hepático alterado) e infecciones del hígado (víricas, bacterianas, fúngicas y parasitarias). Numerosos trastornos de almacenamiento resultantes de los errores innatos del metabolismo a menudo están asociados con fibrosis, incluyendo anomalías en los lípidos (enfermedad de Gaucher); enfermedades de almacenamiento de glucógeno (especialmente tipos III, IV,

VI, IX, y X); deficiencia de antitripsina alfa-1; almacenamiento de sustancias exógenas, como se ve en síndromes de sobrecarga de hierro (hemocromatosis) y enfermedades de almacenamiento de cobre (enfermedad de Wilson); acumulación de metabolitos tóxicos (como en tirosinemia, fructosemia, y galactosemia); y trastornos peroxisomales (síndrome de Zellweger). Numerosos productos químicos y fármacos provocan fibrosis, especialmente alcohol, metotrexato, isoniazida, oxifenisatina, metildopa, clorpromazina, tolbutamida, y amiodarona. Las alteraciones de la circulación hepática (por ejemplo, insuficiencia cardiaca crónica, síndrome de Budd-Chiari, enfermedad veno-oclusiva, trombosis de la vena porta) y la obstrucción crónica al flujo biliar pueden conducir a fibrosis. Por último, la fibrosis hepática congénita es una malformación autosómica recesiva.

El hígado normal está compuesto por hepatocitos y sinusoides distribuidos dentro de una matriz extracelular compuesta por colágeno (predominante tipos I, III, y IV) y proteínas no colágenas, incluyendo glicoproteínas (por ejemplo, fibronectina, laminina) y varios proteoglicanos (por ejemplo, sulfato de heparán, sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, hialuronato). Los fibroblastos, encontrados normalmente en los tractos porta, pueden producir colágeno, grandes glicoproteínas, y proteoglicanos.

Otras células hepáticas (particularmente células estrelladas, hepatocitos y células Kupffer de almacenamiento de grasa, y células endoteliales) también pueden producir componentes de matriz extracelular. Las células de almacenamiento de grasa, ubicadas por debajo del endotelio sinusoidal en el espacio de Disse, son precursoras de fibroblastos, capaces de proliferar y producir un exceso de matriz extracelular. El desarrollado de fibrosis a partir de la deposición activa de colágeno es una consecuencia de la lesión celular hepática, particularmente necrosis, y células antiinflamatorias. Los factores precisos liberados a partir de estas células son desconocidos, pero son probables una o más citocinas o productos de peroxidación lipídica. Las células de Kupffer y macrófagos activados producen citocinas antiinflamatorias. Se forman nuevos fibroblastos alrededor de las células hepáticas necróticas; un aumento de la síntesis de colágeno conduce a la cicatrización. Las células estrelladas inactivas pueden activarse, lo que conduce al aumento de la fibrosis. La fibrosis puede derivarse a partir de fibrogénesis activa y a partir de la degradación reducida de colágeno normal o alterado. Las células de almacenamiento de grasa, células de Kupffer, y células endoteliales son importantes en la eliminación de colágeno tipo I, diferentes proteoglicanos, y colágenos desnaturalizados. Los cambios en estas actividades de las células pueden modificar el grado de fibrosis. Para el patólogo, el tejido fibroso puede llegar a ser más evidente a partir del colapso pasivo y la condensación de fibras preexistentes.

Por lo tanto, la síntesis aumentada o degradación reducida de colágeno da como resultado la deposición activa de tejido conectivo excesivo, que afecta la función hepática: (1) La fibrosis pericelular altera la nutrición celular y da como resultado atrofia hepatocelular. (2) Dentro del espacio de Disse, el tejido fibroso se acumula alrededor de los sinusoides y obstruye el paso libre de sustancias de la sangre a los hepatocitos. (3) La fibrosis alrededor de las vénulas hepáticas y los tractos porta interrumpen el flujo sanguíneo hepático. La resistencia venosa a través del hígado aumenta desde las ramas de la vena porta a los sinusoides y finalmente a las venas hepáticas. Pueden estar implicadas las tres rutas.

Las bandas fibrosas que unen los tractos porta con venas centrales también promueven canales anastomóticos: la sangre arterial, que deriva los hepatocitos normales, se desvía a venas eferentes hepáticas, lo que disminuye de forma adicional la función hepática y puede acentuar la necrosis hepatocelular. El grado al cual estos procesos están presentes determina la magnitud de la disfunción hepática: por ejemplo, en fibrosis hepática congénita, las bandas fibrosas grandes implican predominantemente las regiones porta pero normalmente evitan el parénquima hepático. Por lo tanto, la fibrosis hepática congénita se presenta como hipertensión porta con función hepatocelular conservada.

La esclerodermia es una enfermedad del tejido conectivo caracterizada por fibrosis de la piel y órganos internos, que conduce a insuficiencia orgánica y la muerte (Black et al., 1998; Clements y Furst, 1996; para revisiones, véase Varga J. 2004. Chung y Utz, 2004. Rhew y Barr, 2004). La esclerodermia tiene un espectro de manifestaciones y una diversidad de implicaciones terapéuticas. Comprende esclerodermia localizada, esclerosis sistémica, trastornos tipo esclerodermia, y esclerodermia Sine (Smith, 2000). Mientras que la esclerodermia localizada es una enfermedad dermatológica rara asociada con fibrosis y manifestaciones limitadas a la piel, la esclerosis sistémica es una enfermedad multisistémica con riesgo variable para afectación de órganos internos y variación en el grado de enfermedad de la piel. La esclerosis sistémica puede ser difusa o limitada. La esclerosis sistémica limitada también se denomina CREST (calcinosis, disfunción esofágica de Raynaud, esclerodactilia, telangiectasia). Se cree que los trastornos tipo esclerodermia están relacionados con exposición al entorno industrial. En la enfermedad de Sine, existe afectación de órganos internos sin cambios en la piel.

Las manifestaciones principales de la esclerodermia y en particular de esclerosis sistémicas, son deposición y síntesis de colágeno excesiva inapropiada, disfunción endotelial, espasmos, colapso y obliteración por fibrosis.

La esclerodermia es una enfermedad rara con una incidencia estable de aproximadamente 19 casos por 1 millón de personas. La causa de la esclerodermia es desconocida. Sin embargo, la predisposición genética es importante. Las anormalidades implican autoinmunidad y alteración de la función de fibroblastos y células endoteliales. De hecho, la esclerosis sistémica es probablemente una de las enfermedades autoinmunes más graves con una mortalidad notificada del 50 % dentro de un periodo de 5 años de diagnóstico (Silman, 1991).

En términos de diagnóstico, un parámetro clínico importante es el engrosamiento de la piel proximal a las articulaciones metacarpofalángicas. El fenómeno de Raynaud es un componente frecuencia, casi universal de la esclerodermia. Se diagnostica por cambios de color de la piel tras la exposición al frío. La isquemia y el engrosamiento en la piel son síntomas de la enfermedad de Raynaud.

Varios procesos biológicos subyacentes están aplicados en el inicio, gravedad y avance de la enfermedad e incluyen disfunción vascular, daño y activación de las células endoteliales, acumulación de leucocitos, producción de auto-anticuerpos y crucialmente, una respuesta fibrótica no controlada que puede conducir a la muerte (Clements y Furst, 1996). Los fibroblastos tienen un papel fundamental en la patogénesis de esta enfermedad. Los fibroblastos primarios obtenidos a partir de pacientes con esclerodermia muestran muchas de las propiedades características de la enfermedad vistas *in vivo*, deposición y síntesis de matriz extracelular notablemente aumentadas, particularmente de colágeno y fibronectina, y factor de crecimiento alterado y producción de citocinas tal como de TGF-β y CTGF (Strehlow y Korn, 1998 y LeRoy, 1974).

La materia objeto divulgada en el presente documento se refiere a un tratamiento de fibrosis, incluyendo, pero sin limitación, fibrosis asociada con esclerodermia, utilizando células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares. Existen diferentes tipos de esclerodermia. La forma fibrótica multi-sistémica, también denominada esclerosis sistémica, comprende dos subtipos dependiendo del grado de afectación de la piel: La forma cutánea limitada afecta a las extremidades mientras que el subtipo difuso también implica el tronco. Además de la enfermedad sistémica, existen formas localizadas de la enfermedad, incluyendo, por ejemplo, morfea, que implica ciertas áreas de la piel, algunas veces articulaciones y músculos, pero no los órganos internos. Las características principales de la esclerosis sistémica son fibrosis progresiva y daño microvascular extendido de la piel y órganos internos. El síntoma clínico más evidente es por lo general el endurecimiento de la piel y la cicatrización asociada. La piel puede parecer tensa, rojiza o escamosa. A pesar del avance en el manejo de las complicaciones que se presentan principalmente debido a la insuficiencia orgánica, hasta la fecha, aún no existe cura ni tratamiento específico de la enfermedad. Además, pueden verse afectados el hígado, riñones, pulmones, corazón y pericardio, ojos, piel, boca, páncreas, tracto gastrointestinal, cerebro, mama, médula ósea, huesos, aparato genitourinario, un tumor, o una herida.

Las células descritas en el presente documento, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, pueden tratar o prevenir la fibrosis resultante de afecciones incluyendo, pero sin limitación, artritis reumatoide, lupus, fibrosis patogénica, enfermedad fibrosante, lesiones fibróticas tal como las formadas después de la infección por Schistosoma japonicum, daño por radiación, enfermedades autoinmunes, enfermedad de Lyme, fibrosis inducida por quimioterapia, fibrosis inducida por radiación, VIH o esclerosis focal inducida por infección, síndrome de espalda fallida debido a cicatrices de cirugía espinal, adherencia abdominal después de la cirugía de cicatrices, formaciones fibroquísticas, fibrosis después de lesión espinal, fibrosis inducida por cirugía, fibrosis de la mucosa, fibrosis peritoneal provocada por diálisis, y fibrosis pulmonar asociada con Adalimumab.

Específicamente, en el hígado, las células descritas en el presente documento, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, pueden tratar o prevenir la fibrosis resultante de afecciones que incluyen, pero sin limitación, alcohol, fármacos, y/o cirrosis inducida químicamente, lesión por reperfusión isquémica después de trasplante hepático, hepatitis necrotizante, hepatitis B, hepatitis C, cirrosis biliar primaria, y colangitis esclerosante primaria.

Con referencia a los riñones, las células descritas en el presente documento, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, pueden tratar o prevenir la fibrosis resultante de afecciones que incluyen, pero sin limitación, glomerulonefritis esclerosante y proliferativa, dermopatía fibrosante nefrogénica, nefrotapatía diabética, fibrosis tubulointersticial renal, y glomeruloesclerosis segmentaria focal.

Con referencia a los pulmones, las células descritas en el presente documento, por ejemplo, ADC, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, pueden tratar o prevenir la fibrosis resultante de afecciones que incluyen, pero sin limitación, fibrosis intersticial pulmonar, sarcoidosis, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad por daño alveolar difuso, hipertensión pulmonar, displasia broncopulmonar neonatal, asma crónico, y enfisema. Existen diferentes subnombres o sinónimos para fibrosis pulmonar que incluyen, pero sin limitación, alveolitis fibrosante criptogénica, fibrosis intersticial difusa, neumonitis intersticial idiopática, síndrome de Hamman-Rich, silicosis, asbestosis, beriliosis, neumoconiosis del minero, enfermedad del pulmón negro, enfermedad de minero de carbón, asma del minero, antracosis, y antracosilicosis.

Con referencia al corazón y/o el pericardio, las células derivadas de tejido adiposo descritas en el presente documento, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, pueden tratar o prevenir la fibrosis resultante de afecciones que incluyen, pero sin limitación, fibrosis del miocardio, ateroclerosis, restenosis de la arteria coronaria, cardiomiopatía congestiva, insuficiencia cardiaca y otras afecciones post-isquémicas.

Con referencia a los ojos, las células derivadas de tejido adiposo descritas en el presente documento, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, pueden tratar o prevenir la fibrosis resultante de afecciones que incluyen, pero sin limitación, exoftalmos de la enfermedad de Grave, vitreorretinopatía proliferativa, catarata de la cápsula anterior, fibrosis corneal, cicatrización de la córnea debido a la cirugía, fibrosis inducida por trabeculectomia, fibrosis sub-retiniana progresiva, coriorretinitis granulomatosa multifocal, y otras fibrosis de los ojos.

Con referencia a la piel, las células derivadas de tejido adiposo descritas en el presente documento, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, pueden tratar o prevenir la fibrosis resultante de afecciones que incluyen, pero sin limitación, contractura de Depuytren, esclerodermia, cicatrices queloides, psoriasis, cicatrización hipertrófica debido a quemaduras, aterosclerosis, restenosis, fibrosis cutánea que surge de la exposición a quimioterapia, y las pseudo-esclerodermia provocada por lesión de la médula espinal.

Con referencia a la boca y/o esófago, las células descritas en el presente documento, células, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, pueden tratar o prevenir fibrosis resultante de afecciones que incluyen, pero sin limitación, cicatrización por enfermedad periodontal, hipertrofia gingival secundaria a fármacos, y estenosis esofágica congénita.

Con referencia al páncreas, las células descritas en el presente documento, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, pueden tratar o prevenir la fibrosis resultante de afecciones que incluyen, pero sin limitación, fibrosis pancreática, pancreatitis de remodelación del estroma, y fibrosis del estroma.

Con referencia al tracto gastrointestinal, las células descritas en el presente documento, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, pueden tratar o prevenir la fibrosis resultante de afecciones que incluyen, pero sin limitación, colitis colágena, atrofia de las vellosidades, hiperplasia de las criptas, formación de pólipos, fibrosis de la enfermedad de Crohn, y curación de la úlcera gástrica.

Con referencia al cerebro, las células descritas en el presente documento, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, pueden tratar o prevenir la fibrosis resultante de afecciones que incluyen, pero sin limitación, tejido de la cicatriz glial.

Con referencia a la mama, las células descritas en el presente documento, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, pueden tratar o prevenir la fibrosis resultante de afecciones que incluyen, pero sin limitación, enfermedad fibroquística y reacción desmoplásica al cáncer de mama, cáncer y fibrosis secundaria al tratamiento para neoplasia de mama.

Con referencia a la médula ósea, las células descritas en el presente documento, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, pueden tratar o prevenir la fibrosis resultante de afecciones que incluyen, pero sin limitación, fibrosis en mielodisplasia y enfermedades neoplásicas.

Con referencia a los huesos, las células descritas en el presente documento, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, pueden tratar o prevenir la fibrosis resultante de afecciones que incluyen, pero sin limitación, formación de pannus reumatoide.

Con referencia al sistema genitourinario, las células descritas en el presente documento, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, pueden tratar o prevenir la fibrosis resultante de afecciones que incluyen, pero sin limitación, endometriosis, fibromas uterinos, fibromas ováricos, y enfermedad de Peyronie.

Con referencia al daño inducido por radiación, las células descritas en el presente documento, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, pueden tratar o prevenir la fibrosis relacionada con, pero sin limitación, tratamiento de cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer gastrointestinal, cáncer de colon, y cáncer de mama.

Métodos de preparación de una población de células derivadas de tejido adiposo que comprende células madre y regenerativas

En algunos casos, el tejido adiposo se procesa para obtener una población refinada, enriquecida, concentrada, aislada, o purificada de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, una población de células derivadas de tejido adiposo que comprende células madre, una población de células derivadas de tejido adiposo que comprende células regenerativas, una población de células derivadas de tejido adiposo que comprende células madre y regenerativas, y similares, útil en los casos divulgados en el presente documento, usando una unidad de procesamiento celular, sedimentación por gradiente, filtración, o una combinación de uno cualquiera o más de estos enfoques. En general, el tejido adiposo se extrae en primer de un sujeto (por ejemplo, un mamífero, un animal doméstico, un roedor, un caballo, un perro, un gato o un ser humano) después, se procesa para obtener una población celular, por ejemplo, una población de células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, una población de células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, una población de células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares. Para trasplante alogénico, se puede seleccionar un donante apropiado utilizando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, métodos utilizados para la selección de donantes de médula ósea. El volumen del tejido adiposo recolectado del paciente puede variar de aproximadamente 1 cc a aproximadamente 2000 cc, y en algunos casos hasta aproximadamente 3000 cc. El volumen del tejido extraído variará de paciente a paciente y dependerá de varios factores, incluyendo, pero sin limitación: edad, hábito corporal, perfil de coagulación, estabilidad hemodinámica, gravedad de la insuficiencia o lesión, co-morbolidades, y la preferencia del médico.

El tejido adiposo se puede obtener mediante cualquier método conocido por una persona experta en la técnica. Por ejemplo, el tejido adiposo se puede extraer de un sujeto por lipoplastia asistida por succión, lipoplastia asistida por

ultrasonido, o lipectomia por escisión. Además, los procedimientos pueden incluir una combinación de dichos procedimientos, tal como una combinación de lipectomia por escisión y lipoplastia asistida por succión. Si el tejido o alguna fracción del mismo está destinado a reimplantación en un sujeto, el tejido adiposo se debe recolectar de manera que conserve la viabilidad del componente celular y que minimice la probabilidad de contaminación del tejido con organismos potencialmente infecciosos, tales como bacterias y/o virus. Por lo tanto, la extracción de tejido se debe realizar de manera estéril o aséptica para minimizar la contaminación. Se puede desear la lipoplastia asistida por succión para extraer el tejido adiposo de un paciente ya que proporciona un método mínimamente invasivo de recolección de tejido con potencial mínimo para daño de células madre que puede estar asociado con otras técnicas, tal como lipoplastia, asistida por ultrasonido.

Por consiguiente, el tejido adiposo proporciona una fuente rica de una población de células que se enriquece fácilmente por células madre derivadas de tejido adiposo, células regenerativas derivadas de tejido adiposo, células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo, o similares. La recolección de tejido adiposo también es más respetuoso con el paciente y está asociada con una menor morbidez que la recolección de un volumen similar de, por ejemplo, piel o un volumen de amígdala mucho más grande.

Para procedimientos lipoplásicos asistidos por succión, el tejido adiposo se recoge mediante inserción de una cánula en o cerca de un depósito de tejido adiposo presente en el paciente seguido de la aspiración del tejido adiposo en un dispositivo de succión. En algunos casos, se puede acoplar una pequeña cánula a una jeringa, y el tejido adiposo se puede aspirar utilizando fuerza manual. El uso de una jeringa u otro dispositivo similar puede ser deseable para recolectar cantidades relativamente moderadas de tejido adiposo (por ejemplo, de 0,1 ml a varios cientos de mililitros de tejido adiposo). Los procedimientos que emplean estos dispositivos relativamente pequeños requieren solamente anestesia local. Los volúmenes más grandes de tejido adiposo (por ejemplo, mayores que varios cientos de milímetros) pueden requerir anestesia general a discreción del donante y la persona que realiza el procedimiento de recolección. Cuando se van a extraer volúmenes más grandes de tejido adiposo, se pueden emplear cánulas relativamente más grandes y dispositivos de succión automatizados.

Los procedimientos de lipectomía por escisión incluyen, y no se limitan a, procedimientos en los que los tejidos que contienen un tejido adiposo (por ejemplo, piel) se extraen como una parte incidental del procedimiento; es decir, cuando el propósito principal de la cirugía es la extracción de tejido (por ejemplo, piel en cirugía bariátrica o estética) y en el que el tejido adiposo se extrae junto con el tejido de interés principal. El tejido adiposo subcutáneo también se puede extraer mediante lipectomía por escisión en la que el tejido adiposo se escinde del espacio subcutáneo sin eliminación concomitante de la piel.

La cantidad de tejido recogido puede depender de varias variables incluyendo, pero sin limitación, el indicio de masa corporal del donante, la disponibilidad de sitios de recolección de tejido adiposo accesibles, afecciones y medicaciones concomitantes y pre-existentes (tal como terapia anticoagulante), y el propósito clínico para el que se recolecta el tejido. La experiencia con trasplante de células madre hematopoyéticas (células madre derivadas de médula ósea o sangre de cordón umbilical utilizadas para regenerar la capacidad de formación celular de la sangre del receptor) muestra que el injerto es dependiente de la dosis de células con efectos de umbral (véase, Smith, et al., 1995; Barker, et al., 2001). Por lo tanto, es posible que el principio general de que "más es mejor" se aplicará dentro de los límites establecidos por otras variables y que siempre que sea posible la recolección recolectará tanto tejido como sea posible.

El tejido adiposo que se extrae de un paciente entonces se recolecta en un dispositivo (por ejemplo, unidad de procesamiento celular, centrifuga, o unidad de filtración) para procesamiento adicional para extraer colágeno, adipocitos, sangre, y solución salina, obteniendo así una población celular que comprende células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares. Preferiblemente, la población de células derivadas de tejido adiposo que contienen ADRC está libre de colágeno contaminante, adipocitos, sangre, y solución salina. Las células contaminantes principales en el tejido adiposo (adipocitos) tienen baja densidad y son fáciles de extraer por flotación.

El procesamiento de tejido adiposo para obtener una población refinada, concentrada, y aislada de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, una población de células derivadas de tejido adiposo que comprende células madre, una población células derivadas de tejido adiposo que comprende células regenerativas, una población células derivadas de tejido adiposo que comprende células madre y células regenerativas, y similares, y modificaciones al mismo se realizan preferiblemente usando métodos descritos, por ejemplo, en la Sol. de Estados Unidos N.º de Ser. 10/316.127 (Pat. de Estados Unidos N.º 2003/0161816), titulada SYSTEMS AND METHODS FOR TREATING

PATIENTS WITH PROCESSED LIPOASPIRATE CELLS, presentada el 9 de diciembre, 2002, y Sol. de Estados Unidos N.º de Ser. 10/877.822 (Pat. de Estados Unidos N.º 2005/0084961), titulada SYSTEMS AND METHODS FOR SEPARATING AND CONCENTRATING REGENERATIVE CELLS FROM TISSUE, presentada el 25 de junio de 2004; Sol. de Estados Unidos N.º de Ser. 10/242.094, titulada PRESERVATION OF NON EMBRYONIC CELLS FROM NON HEMATOPOIETIC TISSUES, presentada el 12 de septiembre de 2002, que reivindica la prioridad de la Sol. de Estados Unidos N.º de Ser. 60/322.070 presentada el 14 de septiembre de 2001; Solicitud de Estados Unidos N.º de Serie 10/884.638, titulada SYSTEMS AND METHODS FOR ISOLATING AND USING CLINICALLY SAFE ADIPOSE DERIVED REGENERATIVE CELLS, presentada el 2 de julio de 2004. Las solicitudes anteriores divulgan el procesamiento de células derivadas de tejido adiposo en un sistema que se configura para mantener una ruta de fluido/tejido cerrada, estéril. Esto se puede lograr mediante el uso de un conjunto conectado, pre-montado de recipientes estériles, cerrados y tubos que permiten la transferencia de elementos de tejido y fluido dentro de una ruta cerrada. Este conjunto de procesamiento se puede conectar a una serie de reactivos de procesamiento (por ejemplo, solución salina, enzimas, etc.) insertados en un dispositivo, que puede controlar la adición de reactivos, la temperatura, y la temporización del procesamiento librando así a los operadores de la necesidad de gestionar manualmente el proceso. En un caso preferido, todo el procedimiento de extracción de tejido a través del procesamiento y colocación en el recipiente se realiza en la misma instalación, en realidad, incluso dentro de la misma sala, del paciente que se somete al procedimiento.

Para muchas aplicaciones, la preparación de la población celular activa requiere el agotamiento del componente de adipocitos cargados de grasa maduros del tejido adiposo. Esto se puede lograr mediante una serie de etapas de lavado y desagregación en las que el tejido primero se aclara para reducir la presencia de lípidos libres (librados de adipocitos con ruptura) y elementos de la sangre periférica (liberados de vasos sanguíneos cortados durante la recolección de tejidos), y entonces desagregarse para liberar adipocitos intactos y otras poblaciones celulares de la matriz de tejido conectivo. En algunos casos, las células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, están dotadas de células endoteliales de los vasos sanguíneos (BEC), células progenitoras BEC (EPC), y células madre derivadas de tejido adiposo, células estromales derivadas de tejido adiposo, y otros elementos celulares. En algunos casos, las células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, comprenden células que están en forma de agregados o fragmentos parcialmente desagregados, por ejemplo, dos o más células vasculares unidas por matriz extracelular. En algunas realizaciones estos agregados comprenden grandes agregados o fragmentos que comprenden más de 10 células o más de 100 células unidas por matriz extracelular. Dichos agregados pueden incluir, pero sin limitación, fragmentos de vasos sanguíneos o linfáticos en los que varias células permanecen unidas en una aproximación de su orientación original entre sí (incluyendo, a modo de ejemplo no limitante, células endoteliales vasculares y pericitos o células del músculo liso unidas por alguna parte de o toda la matriz extracelular que las une conjuntamente en el tejido antes del procesamiento). En un caso particular dichos agregados pueden comprender varios cientos de células en contacto o asociadas con un menor número de adipocitos de los que eran en el tejido antes del procesamiento.

El aclarado es una etapa opcional pero preferida, en la que el tejido se mezcla con una solución para lavar componentes celulares individuales y lípidos libres, tal como estos componentes en la sangre, dejando fragmentos de tejido adiposo intactos. En un caso, el tejido adiposo que se extrae del paciente se mezcla con una solución salina isotónica u otras soluciones fisiológicas, por ejemplo, Plasmalyte® de Baxter Inc. o Normosol® de Abbott Labs. Los fragmentos de tejido adiposo intactos se pueden separar del lípido libre y las células por cualquier medio conocido por un experto en la técnica que incluye, pero sin limitación, filtración, decantación, sedimentación, o centrifugación. En algunos casos, el tejido adiposo se separa de tejido no adiposo empleando un filtro dispuesto dentro de un recipiente de recolección de tejido, como se analiza en el presente documento. En otras realizaciones, el tejido adiposo se separa de tejido no adiposo usando un recipiente de recolección de tejido que utiliza técnicas de decantación, sedimentación y/o centrifugación para separar los materiales.

Los fragmentos de tejido intactos entonces se desagregan utilizando cualquier técnica o método convencional, que incluye fuerza mecánica (fuerzas de trituración o cizallamiento), energía ultrasónica u otra energía física, láser, microondas, digestión enzimática con enzimas proteolíticas individuales o combinatorias, tales como colagenasa, tripsina, lipasa, liberasa H1, nucleasas, o miembros de la familia Blendzyme como se divulga en la Pat. de Estados Unidos N.º 5.952.215, "Enzyme composition for tissue dissociation", y pepsina, o una combinación de métodos mecánicos y enzimáticos. Por ejemplo, el componente celular de los fragmentos de tejido intactos se puede desagregar mediante métodos utilizando disociación mediada por colagenasa de tejido adiposo, similar a los

métodos para recolectar células endoteliales microvasculares en tejido adiposo, como se divulga en la Pat. de Estados Unidos N.º 5.372.945. Se divulgan métodos adicionales usando colagenasa que pueden usarse en, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 5.830.741, "Composition for tissue dissociation containing collagenase I and II from clostridium histolyticum and a neutral protease" y por Williams, et al., 1995, "Collagenase lot selection and purification for adipose tissue digestion", Cell Transplant 4(3): 281-9. De forma similar, se puede utilizar una proteasa neutra en lugar de colagenasa, como se divulga en Twentyman, et al. (Twentyman, et al., 1980, "Use of bacterial neutral protease for disaggregation of mouse tumours and multicellular tumor spheroids," Cancer Lett. 9(3): 225-8). Además, los métodos descritos en el presente documento pueden emplear una combinación de enzimas, tal como una combinación de colagenasa y tripsina o una combinación de una enzima, tal como tripsina, y disociación mecánica.

Las células derivadas de tejido adiposo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, entonces se pueden obtener de los fragmentos de tejido desagregados reduciendo el número de adipocitos maduros. Entonces se hace pasar una suspensión del tejido adiposo desagregado y el líquido en el que se desagregó el tejido adiposo a otro recipiente, tal como un recipiente de recolección de células. La suspensión puede fluir a través de uno o más conductos al recipiente de recolección de células usando una bomba, tal como una bomba peristáltica, que extrae la suspensión del recipiente de recolección de tejido y lo impulsa al recipiente de recolección de células. Otros casos pueden emplear el uso de gravedad o un vacío mientras que se mantiene un sistema cerrado. La separación de las células en la suspensión se puede lograr mediante sedimentación de densidad de flotación, centrifugación, elutriación, filtración, adherencia diferencial a y elución de restos de fase sólida, selección mediada por anticuerpos, diferencias en la carga eléctrica, perlas inmunomagnéticas, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), u otros medios. Los ejemplos de estas diversas técnicas y dispositivos para realizar las técnicas se pueden encontrar en las Pat. de Estados Unidos N.º 6.277.060; 6.221.315; 6.043.066; 6.451.207; 5.641.622; y 6.251.295. Muchos de estos dispositivos se pueden incorporar dentro de la unidad de procesamiento celular, mientras que se mantiene un sistema cerrado.

En algunos casos, las células en la suspensión se separan del componente acelular de la suspensión usando un filtro de membrana para centrifugación. En otros casos, las células en la suspensión se separan del componente acelular utilizando una centrífuga. En este caso ejemplar, el recipiente de recolección de células puede ser una bolsa flexible que se estructura para que se coloque en una centrífuga (por ejemplo, de forma manual o por robótica). En otros casos, no se utiliza una bolsa flexible. Después de la centrifugación, el componente celular que contiene ADRC forma un sedimento, que entonces se puede suspender de nuevo con una solución tamponada de manera que las se puedan pasar a través de uno o más conductos a un recipiente mezclador, como se analiza en el presente documento. Los fluidos de resuspensión se pueden proporcionar mediante cualquier medio adecuado. Por ejemplo, un tampón se puede inyectar en un puerto en el recipiente de recolección de células, o el recipiente de recolección de células puede incluir una reserva de tampón que se puede mezclar con el sedimento de células mediante la ruptura de la reserva. Cuando se utiliza un filtro de membrana para centrifugación, la resuspensión es opcional ya que las células permanecen en un volumen de líquido después del procedimiento de separación.

En un caso, se selecciona una subpoblación de las células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, de otras células por adherencia de corto plazo a una superficie, por ejemplo, plástico. En un caso, la duración de adherencia para el propósito de selección es de aproximadamente una hora. En un segundo caso, la duración de adherencia a la superficie es de 24 horas.

Aunque algunos casos descritos en el presente documento están dirigidos a métodos de desagregación completa del tejido adiposo para separar las células activas de los adipocitos maduros y el tejido conectivo, los casos adicionales están dirigidos a métodos en los que el tejido adiposo se desagrega sólo parcialmente. Por ejemplo, la desagregación parcial se puede realizar con una o más enzimas, que se eliminan de al menos una parte del tejido adiposo de forma temprana con respecto a una cantidad de tiempo que la enzima se dejará de otro modo sobre la misma para desagregar completamente el tejido. Tal proceso puede requerir menos tiempo de procesamiento y generará fragmentos de componentes de tejido dentro de los cuales múltiples células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, permanecen en contacto parcial o completo. En otro caso, se aplica fuerza mecánica (por ejemplo energía de ultrasonido o fuerza de cizallamiento) para preparar las células, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células

regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, y/o fragmentos que comprenden células derivadas de tejido adiposo aisladas de todos o algunos de los adipocitos maduros con los que se asociaban en el tejido antes del procesamiento.

En algunos casos, el tejido se lava con una solución salina isotónica tamponada estéril y se incuba con colagenasa a una concentración de colagenasa, una temperatura, y durante un periodo de tiempo suficiente para proporcionar la desagregación adecuada. En un caso preferido, la enzima colagenasa utilizada se aprobará para uso humano por la autoridad relevante (por ejemplo, la U. S. Food and Drug Administration). Las preparaciones de colagenasa adecuadas incluyen colagenasa recombinante y no recombinante. La colagenasa no recombinante puede obtenerse a partir de F. Hoffmann-La Roche Ltd., Indianapolis, IN y/o Advance Biofactures Corp., Lynbrook, NY. La colagenasa recombinante también puede obtenerse como se divulga en la Pat. de Estados Unidos N.º 6.475.764.

En un caso, las soluciones contienen colagenasa a concentraciones de aproximadamente 10 µg/ml a aproximadamente 50 µg/ml (por ejemplo, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, o 50 µg/ml) y se incuban de aproximadamente 30 ºC a aproximadamente 38 ºC durante aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 60 minutos. Estos parámetros variarán de acuerdo con la fuente de la enzima colagenasa, optimizados por estudios empíricos, a fin de confirmar que el sistema es eficaz en la extracción de las poblaciones celulares deseadas en un periodo de tiempo apropiado. Una concentración particular preferida, tiempo y temperatura es de 20 µg/ml de colagenasa (mezclada con la dipasa proteasa neutra; Blendzyme 1, Roche) y se incuba durante 45 minutos a aproximadamente 37 ºC. Un caso alternativo preferido aplica 0,5 unidades/ml de colagenasa (mezclada con la termolisina proteasa neutra; Blendzyme 3). En un caso particularmente preferido, la enzima colagenasa utilizada es un material aprobado para su uso humano por la autoridad relevante (por ejemplo, la U.S. Food and Drug Administration). La colagenasa utilizada debe estar libre de microorganismos y contaminantes, tal como endotoxina.

Después de la desagregación, la población celular activa se puede lavar/enjuagar para eliminar aditivos y/o subproductos del proceso de desagregación (por ejemplo, colagenasa y lípidos libres recién liberados). La población celular activa entonces se puede concentrar por centrifugación u otros métodos conocidos por los expertos en la técnica, como se ha analizado anteriormente. Estas etapas de lavado/concentración después del procesamiento se pueden aplicar de forma separada o de forma simultánea. En un caso, las células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, se concentran y la colagenasa se elimina al hacer pasar la población celular a través de un sistema de membrana para centrifugación de flujo continuo o similar, tal como, por ejemplo, el sistema divulgado en las Pat. de Estados Unidos N.º 5.034.135 y 5.234.608.

Además de lo anterior, existen muchos métodos de post-lavado conocidos que se pueden aplicar para purificar de forma adicional la población celular derivada de tejido adiposo que comprende células madre, células regenerativas, células madre y células regenerativas, y similares. Estos incluyen tanto selección positiva (selección de las células diana), selección negativa (eliminación selectiva de células no deseadas), o combinaciones de los mismos. Además de la separación por citometría de flujo como se describe en el presente documento y en la bibliografía, las células se pueden separar en base a varios parámetros diferentes que incluyen, pero sin limitación, carga o tamaño (por ejemplo, por dielectroforesis o diversos métodos de centrifugación, etc.).

Muchas otras conformaciones de los mecanismos por fases utilizados para procesamiento celular serán evidentes para un experto en la técnica. Por ejemplo, la mezcla del tejido y la solución salina durante el lavado y la desagregación puede presentarse por agitación o por recirculación de fluido. El lavado de células se puede mediar por un mecanismo de flujo continuo tal como el enfoque de membrana para centrifugación, adherencia diferencial, centrifugación diferencial (incluyendo, pero sin limitación, sedimentación diferencial, velocidad, o separación por gradiente), o mediante una combinación de medios. De forma similar, componentes adicionales permiten la manipulación adicional de células, incluyendo además de factores de crecimiento u otros modificadores de respuesta biológica, y la mezcla de células con componentes naturales o sintéticos propuestos para implante con las células en el receptor.

La manipulación después del procesamiento también puede incluir cultivo celular o purificación de células adicional (Kriehuber, et al., 2001; Garrafa, et al., 2006). En algunos casos, una vez que se obtiene la población de células derivadas de tejido adiposo, células, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, se refina, se concentra, se enriquece, se aísla, o se purifica utilizando un dispositivo de clasificación celular y/o sedimentación por gradiente. Los mecanismos para

realizar estas funciones se pueden integrar dentro de los dispositivos descritos o se pueden incorporar en dispositivos separados. En muchas realizaciones, sin embargo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una población concentrada de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, se utiliza para preparar un medicamento para la reducción del dolor y/o fibrosis (por ejemplo, en esclerodermia, síndrome de Raynaud, u otras enfermedades y trastornos vinculados con fibrosis), en el que la población concentrada de células se va a administrar a un paciente que lo necesite sin cultivar las células antes de administrarlas al paciente. Es decir, algunas realizaciones se refieren a métodos para reducir el dolor, la fibrosis, o ambos, en los que una cantidad terapéuticamente eficaz de una población concentrada de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, se administra a un paciente que lo necesite sin cultivar las células antes de administrarlas al paciente.

En un caso preferido, el sistema de extracción de tejido y el conjunto de procesamiento estarán presentes en la proximidad del paciente que recibe el tratamiento, tal como la sala de operaciones o sala de procedimientos ambulatorios (eficazmente junto a la cama del paciente). Esto permite una recolección y procesamiento de tejido rápidos, eficientes, y disminuye la oportunidad de error de etiquetado/manipulación de especimenes, permitiendo así la realización del proceso completo en el transcurso de un único procedimiento quirúrgico.

Como se describe en la Solicitud de Estados Unidos N.º 10/884.638, titulada SYSTEMS AND METHODS FOR ISOLATING AND USING CLINICALLY SAFE ADIPOSE DERIVED REGENERATIVE CELLS, presentada el 2 de julio 2004, pueden añadirse uno o más aditivos a las células durante y/o después del procesamiento. Algunos ejemplos de aditivos incluyen agentes que optimizan el lavado y la desagregación, aditivos que mejoran la viabilidad de la población celular activa (por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares), durante el procesamiento, agentes antimicrobianos (por ejemplo, antibióticos), aditivos que lisan adipocitos y/o glóbulos rojos, o aditivos que enriquecen las poblaciones celulares de interés (mediante adherencia diferencial a restos de fase sólida o para promover de otro modo la reducción o enriquecimiento sustanciales de las poblaciones celulares).

Las células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, obtenidas como se describe en el presente documento se pueden cultivar de acuerdo con enfoques conocidos en la técnica, y las células cultivadas se pueden utilizar en varios de los métodos incorporados. Por ejemplo, las células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, se pueden cultivar en placas revestidas con colágeno o cultivos en gel de colágeno 3D en medio basal de células endoteliales en presencia de suero bovino fetal elevado o reducido o producto similar, como se describe en Ng, et al., noviembre de 2004, "Interstitial flow differentially stimulates blood and lymphatic endothelial cell morphogenesis in vitro", Microvasc Res. 68(3): 258-64. Como alternativa, las células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, se pueden cultivar en otras placas revestidas con proteínas de matriz extracelular. Los ejemplos de proteínas de matriz extracelular que se pueden utilizar incluyen, pero sin limitación, fibronectina, laminina, vitronectina, y colágeno IV. También se puede utilizar gelatina o cualquier otro compuesto o soporte, que promueve de forma similar la adhesión de las células endoteliales en los vasos de cultivo para cultivar ADRC.

Los ejemplos de medios de cultivo basal que se pueden utilizar para cultivar células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, *in vitro* incluyen, pero sin limitación, EGM, RPMI, M199, MCDB131, DMEM, EMEM, McCoy's 5A, medio de Iscove, medio de Iscove modificado o cualquier otro medio conocido en la técnica para soportar el crecimiento de células endoteliales sanguíneas. Los ejemplos de factores suplementarios o compuestos que se pueden añadir al medio de cultivo basal que se pueden utilizar para cultivar ADRC incluyen, pero sin limitación, ácido ascórbico, heparina, factor de crecimiento de células endoteliales, complemento de crecimiento endotelial, glutamina, HEPES, suero Nu, suero bovino fetal, suero humano, suero equino, suero de caballo derivado de plasma, suero de ternera complementado con hierro, penicilina, estreptomicina, anfotericina B, factores de

crecimiento de fibroblastos ácidos y básicos, factor de crecimiento tipo insulina, medio acondicionado de astrocitos, medio acondicionado de fibroblastos o células tipo fibroblastos, hidrogenocarbonato de sodio, factor de crecimiento epidérmico, extracto de pituitaria bovina, sulfato de magnesio, isobutilmetilxantina, hidrocortisona, dexametasona, dibutiril AMP cíclico, insulina, transferrina, selenita de sodio, estradiol, progesterona, hormona de crecimiento, angiogenina, angiopoyetina-1, Del-1, folistatina, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), eritropoyetina, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)/factor de dispersión (SF), leptína, midkina, factor de crecimiento placentario, factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas (PD-ECGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB (PDGF-BB), pleiotrofina (PTN), progranulina, proliferina, factor de crecimiento transformante alfa (TGF-alfa), factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)/factor de permeabilidad vascular (VPF), interleucina-3 (IL-3), interleucina 7 (IL-7), interleucina-8 (IL-8), efrinas, metaloproteinasas de matriz (tal como MMP2 y MMP9), o cualquier otro compuesto conocido en la técnica para promover la supervivencia, proliferación o diferenciación de células endoteliales.

El procesamiento adicional de las células también puede incluir: expansión celular (de uno o más tipos de células regenerativas) y mantenimiento celular (que incluyen aclarado de la capa celular y cambios de medios); sub-cultivo; siembra celular; transfección transitoria (incluyendo siembra de células transfectadas de suministro a granel); recolección (incluyendo recolección enzimática, no enzimática y recolección por raspado mecánico); medición de viabilidad celular; revestimiento celular (por ejemplo, sobre placas de micro-titulación, incluyendo la recolección de células de concavidades individuales para expansión, expansión de células en concavidades frescas); cribado de alto rendimiento; aplicaciones de terapia celular; aplicaciones de terapia génica; aplicaciones de ingeniería tisular; aplicaciones de proteínas terapéuticas; aplicaciones de vacunas víricas; recolección de células regenerativas o sobrenadante para el banco o cribado, medición de crecimiento celular, lisis, inoculación, infección o inducción; generación de líneas celulares (incluyendo células de hibridoma); cultivo de células para estudios de permeabilidad; células para ARNi y estudios de resistencia vírica; células para estudios animales inactivados y transgénicos; estudios de purificación por afinidad; aplicaciones de biología estructural; desarrollo de ensayos y aplicaciones de ingeniería de proteínas.

En general, un sistema útil para aislar una población de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, una población de células derivadas de tejido adiposo que comprende células madre, una población de células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, una población de células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y células regenerativas, comprende a) un recipiente de recolección de tejido que incluye i) un puerto de entrada de recolección de tejido estructurado para recibir tejido adiposo extraído de un sujeto, y ii) un filtro dispuesto dentro del recipiente recolección de tejido, que está configurado para retener la población de células derivadas de tejido adiposo del sujeto y para pasar adipocitos, sangre, y solución salina; b) un recipiente mezclador o cámara de procesamiento celular acoplada al recipiente de recolección de tejido mediante un conducto de tal forma que se mantiene una ruta cerrada, en el que dicho recipiente mezclador recibe dicha población celular y dicho recipiente mezclador comprende un puerto de aditivo para introducir al menos un aditivo a dicha población de células derivadas de tejido adiposo; y un puerto de salida configurado para permitir la eliminación de dicha población de células derivadas de tejido adiposo del recipiente mezclador o cámara de procesamiento celular para administración a un paciente. En algunos casos, dicho recipiente mezclador o recipiente de procesamiento celular comprende además un dispositivo de concentración celular tal como un filtro de membrana para centrifugación y/o una centrífuga. Los aspectos de la presente divulgación también incluyen un clasificador celular, que se une a dicha cámara mezcladora o cámara de procesamiento celular mediante un conducto y se configura para recibir células de dicha cámara mezcladora o cámara de procesamiento celular, mientras que se mantiene una ruta cerrada. Los aspectos de la divulgación anterior también pueden incluir una centrífuga unida a dicha cámara mezcladora o cámara de procesamiento celular mediante un conducto y configurada para recibir dicha población de células derivadas de tejido adiposo, mientras que se mantiene una ruta cerrada, en la que dicha centrífuga comprende un gradiente adecuado para separación adicional y purificación de dicha población de células derivadas de tejido adiposo (por ejemplo, ficoll-hypaque). Dicha centrífuga que contiene dicho gradiente, que se configura para recibir dicha población de células derivadas de tejido adiposo también puede estar contenida dentro de dicho recipiente mezclador o cámara de procesamiento celular.

Medición de ADRC y subconjuntos de ADCR en una población celular aislada

Una medición, análisis, o caracterización de la población de células derivadas de tejido adiposo descritas en el presente documento para determinar la presencia de ciertas células en la población se puede llevar a cabo dentro del sistema cerrado de una unidad de procesamiento celular o fuera del sistema cerrado de una unidad de procesamiento celular utilizando cualquier número de ensayos de detección de proteínas y/o ARN disponibles en la

técnica. De forma adicional, la medición, análisis, o caracterización de las células derivadas de tejido adiposo, o ciertas células (por ejemplo, células madre, células progenitoras, células precursoras, y similares), pueden ser parte de o pueden acompañar al procedimiento de aislamiento (por ejemplo, clasificación celular usando un anticuerpo específico para ciertos tipos de célula (por ejemplo, células regenerativas) o separación por gradiente usando un medio selectivo para ciertos tipos de células).

En algunos casos, la medición o caracterización de la población celular aislada se lleva a cabo al detectar la presencia o ausencia de un marcador de proteína que es único para ciertos tipos de células (por ejemplo, células regenerativas derivadas de tejido adiposo, células madre derivadas de tejido adiposo, células precursoras derivadas de tejido adiposo, células progenitoras derivadas de tejido adiposo, células endoteliales, células precursoras endoteliales, o similares) se considera de otro modo para confirmar la presencia del tipo específico de célula de interés por los expertos en la técnica. Además de las transferencias de Western convencionales usando sondas de anticuerpos específicas para dichas proteínas o marcadores, se pueden realizar técnicas de inmunoselección que aprovechen la expresión de marcadores de superficie celular utilizando varios métodos conocidos en la técnica y descritos en la bibliografía. Estos enfoques se pueden realizar utilizando un anticuerpo que se une directamente o indirectamente a un sustrato sólido (por ejemplo, perlas magnéticas) junto con un dispositivo manual, automatizado, o semi-automatizado como se describe por Watts, et al., para separación de células CD34-positivas (Watts, et al., 2002, Variable product purity and functional capacity after CD34 selection: a direct comparison of the CliniMACS (v2.1) and Isolex 300i (v2.5) clinical scale devices", Br J Haematol. 2002 Jul; 118(1): 117 -23), mediante adsorción, uso de un clasificador celular activado por fluorescencia (FACS), u otros medios.

La separación, medición, y caracterización también se pueden lograr mediante selección positiva usando anticuerpos que reconocen marcadores de superficie celular o combinaciones de marcadores que se expresan por ciertos tipos celulares, pero no por uno o más de los otros tipos celulares o sub-poblaciones presentes dentro de la población celular. La separación, medición, y caracterización también se pueden lograr mediante selección negativa, en la que se eliminan tipos de células no deseados de la población aislada de células derivadas de tejido adiposo utilizando anticuerpos o combinaciones de anticuerpos que no muestran unión apreciable a ADRC. Se han descrito marcadores que se expresan específicamente por ADRC. Los ejemplos de anticuerpos que se pueden utilizar en selección negativa incluyen, pero sin limitación, marcadores expresados por células endoteliales. Existen muchos otros anticuerpos ya conocidos en la técnica que se pueden aplicar a selección negativa. La especificidad relativa de los marcadores para ADRC también se puede aprovechar en una estrategia de purificación y/o caracterización o medición. Por ejemplo, un ligando marcado con fluorescencia se puede utilizar en clasificación de células basada en FACS, o un ligando conjugado directamente o indirectamente a un sustrato sólido se puede utilizar para separar de una forma análoga a los enfoques de inmunoselección descritos anteriormente.

La medición y caracterización de la población celular derivada de tejido adiposo para determinar la presencia o ausencia de tipo de células específicos (por ejemplo, tipos específicos de células regenerativas) también pueden implicar el análisis de uno o más ARN que codifican una proteína que es única a o está considerada de otra forma por los expertos en la técnica que es un marcador que indica la presencia o ausencia de una ADRC. En algunos casos, por ejemplo, la población celular aislada o una porción de la misma se analiza para determinar la presencia o ausencia de un ARN que codifica una o más de, por ejemplo, CD45, CD11b, CD14, CD68, CD90, CD73, CD31 y/o CD34. La detección de dichos ARN se puede lograr mediante cualquier técnica disponible para un experto en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, hibridación de Northern, metodologías basadas en PCR, ensayos de transcripción (no iniciados), matrices de genes, y chip de genes.

Composiciones que comprenden ADRC y subconjuntos de ADRC

De acuerdo con los enfoques mencionados anteriormente, el tejido adiposo puro se procesa para eliminar sustancialmente adipocitos maduros y tejido conectivo obteniendo así una pluralidad heterogénea de células derivadas de tejido adiposo que comprenden células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, adecuadas para la colocación dentro del cuerpo de un sujeto. Las células derivadas de tejido adiposo extraídas, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, se pueden proporcionar en una composición pura que comprende estas células sustancialmente libres de adipocitos maduros y tejido conectivo o junto con un ingrediente inactivo (por ejemplo, un vehículo) o un segundo ingrediente activo (por ejemplo, células madre derivadas de tejido adiposo y/o célula endotelial derivada de tejido adiposo). Las células se pueden colocar en el receptor en solitario o en combinación

(por ejemplo, en una única composición o co-administradas) con materiales biológicos, tal como células, tejido, fragmentos de tejido, o estimuladores de crecimiento celular y/o diferenciación, soportes, prótesis, o dispositivos médicos. La composición puede incluir componentes adicionales, tal como factores de diferenciación celular, promotores de crecimiento, agentes inmunosupresores, o dispositivos médicos, como se analiza en el presente documento, por ejemplo. En algunos casos, las células, con cualquiera de los aditivos anteriormente mencionados, se colocan en la persona de la cual se obtuvieron (por ejemplo, transferencia autóloga) en el contexto de un único procedimiento operativo con la intención de proporcionar un beneficio terapéutico al receptor.

Por consiguiente, se describen en el presente documento composiciones que comprenden, consisten, o consisten esencialmente en una población celular derivada de tejido adiposo refinada, enriquecida, concentrada, aislada, o purificada, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, y mezclas de estas células con un material biológico, aditivo, soporte, prótesis, o dispositivo médico, incluyendo, pero sin limitación, tejido adiposo sin procesar, adipocitos, matriz de colágeno o soporte, factores de diferenciación celular, promotores de crecimiento, agentes inmunosupresores, tejido adiposo procesado que contiene células madre derivadas de tejido adiposo y/o células progenitoras, y poblaciones celulares que ya contienen una cantidad enriquecida de ADRC. En algunos casos, las composiciones mencionadas anteriormente comprenden una cantidad o concentración de ADRC refinadas, aisladas, o purificadas que es mayor que o igual al 0,5 %-1 %, 1-2 %, 2 %-4 %, 4 %-6 %, 6 %-8 %, 8 %-10 %, 10 %-20 %, 20 %-30 %, 30 %-40 %, 40 %-50 %, 50 %-60 %, 60 %-70 %, 70 %-80 %, 80 %-90 %, o 90 %-100 % de ADRC, en comparación con la población de células de tejido adiposo totales. En algunos casos, las ADRC expresan una cantidad de, por ejemplo, CD45, CD11b, CD14, CD68, CD90, CD73, CD31 y/o CD34.

En algunos casos, la célula derivada de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, descrita en el presente documento se fórmula en composiciones que incluyen al menos un diluyente, adyuvante, o vehículo farmacéuticamente aceptable, usando cualquier técnica de química farmacéutica disponible. En general, esto implica la preparación de composiciones que están esencialmente libres de impurezas que pueden ser perjudiciales para seres humanos o animales.

Se pueden emplear sales y tampones apropiados para estabilizar y facilitar la captación de la población celular derivada de tejido adiposo que comprende ADRC. Las composiciones contempladas en el presente documento pueden comprender una cantidad eficaz de las células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, en un medio acuoso o vehículo farmacéuticamente aceptable.

La administración de las composiciones descritas en el presente documento puede ser a través de cualquier ruta común siempre y cuando el tejido diana esté disponible a través de esa ruta. Las composiciones administradas de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento se pueden introducir en el sujeto mediante, por ejemplo, administración intravenosa, intraarterial, intralinfática, subcutánea, intradérmica, intramuscular, intramamaria, intraperitoneal, intratecal, retrovulvar, intrapulmonar (por ejemplo, liberación de plazo); mediante administración oral, sublingual, nasal, anal, vaginal o transdérmica, por aerosol u otra aplicación directa, o por implantación quirúrgica en un sitio particular. En cada uno de estos métodos de administración, las composiciones pueden comprender o no un vehículo u otro material que tiene la propiedad de aumentar la retención de la composición en el sitio de acción o de facilitar el tráfico de la composición al sitio de acción. La introducción puede consistir en una única dosis o una pluralidad de dosis durante un periodo de tiempo. Los vehículos para agentes de terapia celular se conocen en la técnica y se han descrito en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. (1990, Mack Publ. Co, Easton Pa. 18042) págs. 1435-1712. Se preparan soluciones estériles incorporando la población celular derivada de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, en la cantidad necesaria en el tampón apropiado con o sin uno o más de los otros componentes descritos en el presente documento.

La terapia de combinación con dos o más agentes descritos en el presente documento también se contempla como un aspecto de esta divulgación. De forma similar, cada combinación de agentes descrita en el presente documento, empaquetada conjuntamente como un nuevo kit, o formulada conjuntamente como una sola composición, se

considera un aspecto de esta divulgación. Las composiciones para su uso de acuerdo con los aspectos de esta divulgación incluyen preferiblemente la población celular derivada de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, formulada con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las células también se pueden aplicar con aditivos para mejorar, controlar, o dirigir de otra forma el efecto terapéutico propuesto. Por ejemplo, en algunos casos, la población celular derivada de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, se puede purificar de forma adicional mediante el uso de selección celular positiva y/o negativa mediada por anticuerpos para enriquecer la población celular para aumentar la eficacia, reducir la morbidez, o facilitar el procedimiento. De forma similar, las células se pueden aplicar con una matriz biocompatible, que facilita el diseño de tejido *in vivo* soportando y/o dirigiendo el destino de las células implantadas. De la misma manera, las células se pueden administrar después de la manipulación genética de tal forma que expresen productos génicos que se cree o se propone que promueven la respuesta terapéutica proporcionada por las células.

La población celular derivada de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, se puede aplicar en solitario o junto con otras células, tejido, fragmentos de tejido, factores de crecimiento, compuestos inertes o biológicamente activos, estructuras de plástico reabsorbible, u otro aditivo destinado a mejorar la administración, eficacia, tolerabilidad, o función de la población. La población celular derivada de tejido adiposo que comprende ADRC también se puede modificar mediante inserción de ADN o mediante colocación en cultivo celular de una forma para cambiar, mejorar, o complementar la función de las células para derivación de un propósito estructural o terapéutico.

En más casos, la población celular derivada de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, se combinan con un gen que codifica una enzima de conversión de profármaco que permite que las células activen profármacos dentro del sitio de injerto, es decir, dentro de un tumor. La adición del gen (o combinación de genes) puede ser mediante cualquier terminología conocida en la técnica que incluye, pero sin limitación, transducción adenoviral, "pistolas génicas", transducción mediada por liposoma, y transducción mediada por retrovirus o lentivirus, plásmido, o virus adeno-asociado. Las células se pueden implantar junto con un material de vehículo que soporta un vehículo de administración génica capaz de liberar y/o presentar genes a las células con el paso del tiempo de tal forma que la transducción puede continuar o se puede iniciar *in situ*. De forma particular, cuando las células y/o tejido que contiene las células se administran a un paciente diferente del paciente del que se obtuvieron las células y/o tejido, se pueden administrar uno o más agentes inmunosupresores al paciente que recibe las células y/o tejido para reducir, y prevenir preferiblemente, el rechazo del trasplante.

Aún más casos se refieren a la transfección *ex vivo* de una población celular derivada de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, y transferencia posterior de estas células transfectadas a sujetos. Se contempla que dichos casos pueden ser un enfoque eficaz para regular *in vivo* los niveles del gen transferido y para proporcionar el alivio de una enfermedad o trastorno resultante de la sub-expresión del uno o más genes o de otra forma sensibles a la regulación del gen (véase, por ejemplo, Gelse, et al., 2003, "Articular cartilage repair by gene therapy using growth factor-producing mesenchymal cells", Arthritis Rheum. 48: 430-41; Huard, et al, 2002, "Muscle-derived cell-mediated ex vivo gene therapy for urological dysfunction", Gene Ther. 9: 1617-26; Kim, et al., 2002, "Ex vivo gene delivery of IL-1Ra and soluble TNF receptor confers a distal synergistic therapeutic effect in antigen-induced arthritis", Mol. Ther. 6: 591-600). La administración de una población celular derivada de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, a células apropiadas se efectúa *ex vivo*, *in situ*, o *in vivo* mediante el uso de vectores, y de forma más particular vectores virales (por ejemplo, adenovirus, virus adeno-asociado, o un retrovirus), o *ex vivo* mediante el uso de métodos de transferencia física de ADN (por ejemplo, tratamientos químicos o liposomas). Véase, por ejemplo, Anderson, 1998, "Human Gene Therapy", Nature Suppl. to vol. 392 (6679): 25-20. También se revisan tecnologías de terapia génica por Friedmann, 1989, "Progress toward human gene therapy", Science 244(4910): 1275-1281, Verma (1990), "Gene therapy". Scientific American 263(5): 68-84, y Miller (1992), "Human gene therapy comes of age," Nature, 357: 455-460. Una población celular derivada de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de

tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, se puede cultivar *ex vivo* en presencia de un aditivo (por ejemplo, un compuesto que induce diferenciación o formación celular pancreática) a fin de proliferar o producir un efecto deseado en o actividad en dichas células. Las células tratadas entonces se pueden introducir a un sujeto.

En algunos casos, la terapia génica *ex vivo* se realiza de forma local, por ejemplo, al sitio de una cicatriz fibrótica. Por ejemplo, mediante el uso de transferencia mediada por catéter se puede transferir una población celular derivada de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, en un sujeto mamífero. Se revisan los materiales y métodos para administración local, por ejemplo, en Lincoff, et al. (1994), "Local drug delivery for the prevention of restenosis. Fact, fancy, and future," Circulation, 90: 2070-2084. Por ejemplo, las células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, se pueden proporcionar a un sujeto mediante un catéter con balón de infusión-perfusión (preferiblemente un catéter con balón micro-poroso), tal como los que se han descrito en la bibliografía para infusiones de fármacos intracoronarios. Véase, por ejemplo, la Pat. de Estados Unidos N.º 5.713.860(Intravascular Catheter with Infusion Array); Pat. de Estados Unidos N.º 5.087.244; Pat. de Estados Unidos N.º 5.653.689; Wolinsky, et al. (1990) (Wolinsky Infusion Catheter), "Use of a perforated balloon catheter to deliver concentrated heparin into the wall of the normal canine artery", J. Am. Coll. Cardiol. 15: 475-481; y Lambert et al., 1993, "Local drug delivery catheters: functional comparison of porous and microporous designs", Coron. Artery Dis. 4: 469-475. El uso de dichos catéteres para terapia génica de células somáticas dirigidas al sitio se describe, por ejemplo, en Mazur, et al., 1994, "Coronary restenosis and gene therapy", Texas Heart Institute Journal 21: 104-111.

Los aspectos de la divulgación también se refieren a la transfección *ex vivo* de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, ADRC (células madre, células progenitoras, células precursoras, o combinaciones de células madre y células progenitoras y/o células precursoras) con un gen que codifica un polipéptido terapéutico, y administración de las células transfectadas al sujeto mamífero. Los procedimientos para la siembra de un injerto vascular con células endoteliales genéticamente modificadas se describen en, por ejemplo, la Pat. de Estados Unidos N.º 5.785.965, "VEGF gene transfer into endothelial cells for vascular prosthesis".

En algunos casos, el paso de administración comprende implantar un dispositivo protésico o médico (por ejemplo, endoprótesis intravascular) en el sujeto mamífero, donde la endoprótesis está revestida o impregnada con una población de células derivadas de tejido adiposo que comprende ADRC. Se describen materiales ejemplares para construir válvulas, endoprótesis o injertos revestidos o diseminados con células endoteliales transfectadas en Pavcnik, et al., 2004, "Second-generation percutaneous bioprosthetic valve: a short-term study in sheep", Eur. J. Endovasc. Surg. 40: 1223-1227, y Arts, et al., 2002, "Contaminants from the Transplant Contribute to Intimal Hyperplasia Associated with Microvascular Endothelial Cell Seeding", Eur. J. Endovasc. Surg. 23: 29-38. Véase también la Sol. de Pat. de Estados unidos N.º de Ser. 11/317.422, titulada CELL-LOADED PROSTHESIS FOR REGENERATIVE INTRALUMINAL APPLICATIONS, presentada el 2 de diciembre de 2005. Por ejemplo, en una variación, una válvula sintética que comprende una población de células derivadas de tejido adiposo que comprende ADRC se sutura a una endoprótesis de acero inoxidable cuadrada. La endoprótesis cuadrada tiene una púa corta en cada extremo para proporcionar anclajes para la válvula durante la colocación, y la membrana sub-mucosa se corta en el eje diagonal de la endoprótesis para crear la abertura de válvula.

Las superficies de la válvula sintética se pueden revestir con una población celular derivada de tejido adiposo transfectada o no transfectada que comprende células regenerativas (por ejemplo, que comprende células madre, que comprende células progenitoras, que comprende células precursoras, u otras células regenerativas - incluyendo cualquier combinación de las mismas), por ejemplo, colocando la válvula sintética en un medio de cultivo celular apropiado durante 1-3 días antes de la implantación para permitir la cobertura completa de la superficie de válvula con las células.

En otro caso, la etapa de administración comprende implantar una endoprótesis intravascular en el sujeto mamífero, donde la endoprótesis se reviste o impregna, como se describe en la bibliografía citada anteriormente y revisada en Lincoff, et al., 1994. Un alambre polimérico o de metal para formar una endoprótesis se reviste con una composición tal como un polímero o gel biocompatible poroso que se impregna con (o se puede sumergir en o revestir de otra forma fácilmente inmediatamente antes del uso con) una población celular derivada de tejido adiposo transfectada o no transfectada que comprende células regenerativas (por ejemplo, que comprende células madre, que comprende

células progenitoras, que comprende células precursoras, u otras células regenerativas - incluyendo cualquier combinación con las mismas). El alambre se enrolla, se trenza, o se forma de otra forma en una endoprótesis adecuada para implantación en el lumen de un vaso usando materiales y técnicas convencionales, tal como cateterización de angioplastia intravascular. Endoprótesis de ejemplo que se pueden mejorar de esta forma se describen y representan en las Pat. de Estados Unidos N.º 5.800.507 y 5.697.967 (Medtronic, Inc., que describe una endoprótesis intraluminal que comprende fibrina y un fármaco eluible capaz de proporcionar un tratamiento de reestenosis); Pat. de Estados Unidos N.º 5.776.184 (Medtronic, Inc., que describe una endoprótesis con un revestimiento poroso que comprende un polímero y una sustancia terapéutica en un sólido o sólido/solución con el polímero); la Pat. de Estados Unidos N.º 5.799.384 (Medtronic, Inc., que describe una endoprótesis flexible, cilíndrica, de metal que tiene una superficie polimérica biocompatible para ponerse en contacto con un lumen corporal); y la Pat. de Estados Unidos N.º 5.824.048, 5.679.400 y 5.779.729.

Como se describe en el presente documento, la población celular derivada del tejido adiposo que comprende células regenerativas (por ejemplo, que comprende células madre, que comprende células progenitoras, que comprenden células precursoras, u otras células regenerativas - incluyendo cualquier combinación de las mismas) se puede proporcionar al sujeto, o aplicar directamente al tejido dañado, o en proximidad al tejido dañado, sin procesamiento adicional o después de los procedimientos adicionales para purificar, modificar, estimular, o cambiar de otra forma de forma adicional las células. Por ejemplo, las células obtenidas de un paciente se pueden proporcionar de nuevo al paciente sin cultivar las células antes de la administración. En diferentes realizaciones, la recolección y procesamiento del tejido adiposo, así como, la administración de la población celular derivada de tejido adiposo que comprende ADRC se realiza junto a la cama de un paciente. En un caso preferido, las células se extraen del tejido adiposo de la persona a la que se van a implantar, reduciendo así complicaciones potenciales asociadas con respuestas antigénicas y/o inmunogénicas al trasplante. Sin embargo, también se contempla el uso de células extraídas de otro individuo.

De acuerdo con la materia objeto divulgada en el presente documento, las células derivadas de tejido adiposo se pueden administrar al paciente poco después de la recolección del tejido adiposo del paciente. Por ejemplo, las células se pueden administrar inmediatamente después del procesamiento del tejido adiposo para obtener una composición de células regenerativas derivadas de tejido adiposo (por ejemplo, células madre derivadas del tejido adiposo, células progenitoras, células precursoras, o cualquier combinación de células regenerativas). En un caso, la temporización preferida de administración debe tener lugar en el orden de horas a días después del diagnóstico de edema o de un procedimiento que probablemente ponga al paciente en riesgo de desarrollar edema. En otro caso, la recolección y, en ciertos casos el tratamiento, pueden tener lugar antes de un procedimiento que probablemente induzca un trastorno pancreático. Por último, la temporización de administración dependerá de la disponibilidad del paciente y el tiempo necesario para procesar el tejido adiposo. En otro caso, el tiempo para la administración puede ser relativamente largo si las células que se van a administrar al paciente se someten a modificación, purificación, estimulación, u otra manipulación adicional, como se analiza en el presente documento. Además, la población celular derivada de tejido adiposo que comprende ADRC se puede administrar múltiples veces. Por ejemplo, las células se pueden administrar de forma continua durante un periodo extendido de tiempo (por ejemplo, horas), o se puede administrar en múltiples inyecciones extendidas sobre un periodo de tiempo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células se pueden administrar en una o más inyecciones (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más), en el tejido afectado del sujeto. A modo de ejemplo, en algunos casos, a un sujeto que tiene esclerodermia se le pueden administrar células derivadas de tejido adiposo como se divulga en el presente documento en uno o una pluralidad de sitios diferentes en cada dedo. Por consiguiente, algunos casos proporcionan la administración de células en cada lado de los dedos, por ejemplo, cada lado del dedo junto a la primera y segunda falange.

El número de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y otras células regenerativas, y similares, administradas a un paciente pueden estar relacionadas con el rendimiento celular después del procesamiento de tejido adiposo. Además, la dosis administrada dependerá de la ruta de administración de las células a un paciente. Un menor número de células puede ser necesario cuando se emplean sistemas de administración intra-pancreáticos, puesto que estos sistemas y métodos pueden proporcionar la ruta más directa para tratar condiciones pancreáticas. La dosis celular administrada al paciente dependerá también de la cantidad de tejido adiposo recolectado y el indicio de masa corporal del donante (como una medición de la cantidad de tejido adiposo disponible). La cantidad de tejido recolectado también se determinará por el grado de la lesión o insuficiencia. Múltiples tratamientos que utilizan múltiples recolecciones de tejido o que utilizan una sola recolección con almacenamiento apropiado de células entre aplicaciones están dentro del alcance de esta invención.

Una porción del número total de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y otras células regenerativas, y similares, se puede retener para su uso posterior o se puede someter a crioconservación. Las porciones del tejido adiposo procesado se pueden almacenar antes de que se administren a un paciente. Para un almacenamiento de corto plazo (por ejemplo, menos de 6 horas) las células se pueden almacenar en o por debajo de la temperatura ambiente en un recipiente sellado con o sin la suplementación con una solución de nutrientes. El almacenamiento a medio plazo (por ejemplo, menos de 48 horas) se realiza preferiblemente a 2-8 ºC en una solución tamponada isosmótica (por ejemplo, Plasmalyte®) en un recipiente compuesto por o revestido con un material que impide la adhesión celular. El almacenamiento a largo plazo se realiza preferiblemente mediante crioconservación apropiada y almacenamiento de las células en condiciones que promueven la retención de función celular, tal como se divulga en la Sol. PCT N.º PCT/US02/29207, presentada el 13 de septiembre de 2002 y la Sol de Pat. de Estados Unidos N.º de Ser. 60/322.070, presentada el 14 de septiembre de 2001.

En algunos casos, la cantidad de células derivadas de tejido adiposo (por ejemplo, una población enriquecida, concentrada, aislada, o purificada de las células derivadas de tejido adiposo que comprenden ADRC), que se proporciona a un sujeto que lo necesita es mayor de o igual a aproximadamente 10.000, 20.000, 30.000, 40.000, 50.000, 60.000, 70.000, 80.000, 90.000, 100.000, 110.000, 120.000, 130.000, 140.000, 150.000, 160.000, 170.000, 180.000, 190.000, o 200.000 células y la cantidad de ADRC (por ejemplo, la cantidad de células madre, células progenitoras, células precursoras, o una combinación de diferentes tipos de células regenerativas - tales como una combinación de células madre y células progenitoras) en dicha población de células derivadas de tejido adiposo puede ser mayor de o igual al 0,5 %-1 %, 1-2 %, 2 %-4 %, 4 %-6 %, 6 %-8 %, 8 %-10 %, 10 %-20 %, 20 %-30 %, 30 %-40 %, 40 %-50 %, 50 %-60 %, 60 %-70 %, 70 %-80 %, 80 %-90 %, o 90 %-100 % de la población total de células derivadas de tejido adiposo. La dosis se puede dividir en varias dosis más pequeñas, por ejemplo, para administración durante un periodo de tiempo o para inyección en diferentes partes del tejido afectado, por ejemplo, por inyección local. Sin embargo, esta dosis se puede ajustar por órdenes de magnitud para lograr el efecto terapéutico deseado.

Las células derivadas de tejido adiposo (por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y otras células regenerativas, y similares) también se pueden someter a cultivo celular en un material de soporte antes de que se implante. Por lo tanto, válvulas de ingeniería tisular, vasos pancreáticos, y otras estructuras se pueden sintetizar en matrices naturales o sintéticas o estructuras utilizando ADRC antes de la inserción o implantación en el receptor.

Muchas rutas de administración pueden ser adecuadas para las terapias descritas en el presente documento. En algunas variaciones, se usan administraciones orales, intravenosa, intraarterial, y otras administraciones sistémicas. En algunas variaciones, se contempla la administración local a un miembro edematoso u otra porción del cuerpo, tal como se administra por vía subcutánea en un sitio de edema.

En algunos casos, se prefiere la administración directa de las células derivadas de tejido adiposo (por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y otras células regenerativas, y similares) al sitio de beneficio propuesto. Esto se puede lograr por inyección local en el tejido, inyección directa en una estructura pancreática o vaso pancreático, a través de la inserción de una cánula adecuada, mediante infusión arterial o venosa (que incluye mecanismos de flujo retrógado) o mediante otros medios divulgados en el presente documento o conocidos en la técnica.

La población celular derivada de tejido adiposo, por ejemplo, la población celular que incluye células madre, células regenerativas, células madre y otras células regenerativas, o similares, se puede aplicar mediante varias rutas que incluyen administración sistémica mediante infusión venosa o arterial (incluyendo infusión de flujo retrógado e incluyendo infusión en vasos sanguíneos y/o linfáticos) o mediante inyección directa. La administración sistémica, particularmente mediante el acceso venoso periférico, tiene la ventaja de que es mínimamente invasiva dependiendo del transporte natural de las células de la sangre al páncreas. La población celular derivada de tejido adiposo que comprende ADRC se puede inyectar en un único bolo, a través de una infusión lenta, o a través de una serie escalonada de aplicaciones separadas por varias horas o, siempre que las células se almacenen de forma apropiada, varios días o semanas. La población celular derivada de tejido adiposo que comprende ADRC también se puede aplicar mediante el uso de cateterización de tal forma que el primer paso de células a través del área de interés se mejora mediante el uso de globos. Como con el acceso venoso periférico, la población celular derivada de

tejido adiposo que comprende ADRC se puede inyectar a través de los catéteres en un único bolo o en múltiples alícuotas más pequeñas. Las células también se pueden inyectar en espacio intersticial o aplicar en forma de un aerosol o lámina.

Como se ha expuesto previamente, en un caso preferido, la población celular derivada de tejido adiposo, por ejemplo, la población celular que incluye células madre, células regenerativas, células madre y otras células regenerativas, o similares, se administra directamente al paciente. En otras palabras, la población celular activa (por ejemplo, las ADRC, células progenitoras, células madre y/o combinaciones de las mismas) se administran al paciente sin que se elimine del sistema o se exponga al entorno externo del sistema antes de que se administre al paciente. Proporcionar un sistema cerrado reduce la posibilidad de contaminación del material que se administra al paciente. Por lo tanto, el procesamiento del tejido adiposo en un sistema cerrado proporciona ventajas con respecto a métodos existentes debido a que la población celular activa es más probable que sea estéril. En algunos casos, la única vez que la población celular derivada de tejido adiposo que comprende ADRC se expone al entorno externo, o se elimina del sistema, es cuando las células se extraen en un dispositivo de aplicación y se administran al paciente. En otros casos, el dispositivo de aplicación también puede ser parte del sistema cerrado. Por consiguiente, se mantiene un sistema cerrado completo de la extracción del tejido adiposo del sujeto (por ejemplo, cánula) a la introducción al sujeto (por ejemplo, dispositivo de aplicación). Por lo tanto, las células utilizadas en estos casos se pueden procesar para cultivo o criopreservación y se pueden administrar a un paciente sin procesamiento adicional, o se pueden administrar a un paciente después de que se mezclan con otros tejidos, células, o aditivos.

En otros casos, al menos una porción de la población celular derivada de tejido adiposo que comprende ADRC se puede almacenar para implantación/infusión posterior. La población se puede dividir en más de una alícuota o unidad de tal forma que parte de la población de células se retiene para aplicación posterior mientras que una parte se aplica inmediatamente al paciente. El almacenamiento moderado a largo plazo de todas o parte de las células en un banco de células también está dentro del alcance de esta divulgación, como se describe en la Sol. de Pat. de Estados Unidos N.º de Ser. 10/242.094, titulada PRESERVATION OF NON EMBRYONIC CELLS FROM NON HEMATOPOIETIC TISSUES, presentada el 12 de septiembre de 2002, que reivindica la prioridad de la Sol. de estados Unidos N.º de Ser. 60/322.070, presentada el 14 de septiembre de 2001. Al final del procesamiento, las células concentradas se pueden cargar en un dispositivo de administración, tal como una jeringa, para su colocación en el receptor mediante cualquier medio conocido por un experto en la técnica. La población celular derivada de tejido adiposo que comprende ADRC con o sin un aditivo se puede utilizar en varios métodos terapéuticos como se describe en la siguiente sección.

Modelos de dolor

En ciertos casos, las células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares descritas en el presente documento se caracterizan por su capacidad de reducir o mejorar el dolor, por ejemplo, en un modelo de dolor animal. Por ejemplo, cuando se produce un lote o grupo de células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo, una muestra del lote o grupo se puede probar usando uno o más modelos animales de dolor. Las células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo, a partir de las cuales se han obtenido las muestras que producen reducciones aceptables en dolor en un ensayo de dolor, entonces se pueden seleccionar para uso adicional, por ejemplo, para la mejora de cualquier tipo de dolor, o para la mejora de un tipo específico de dolor. Se debe entender que las células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo sólo se necesitan probar en, y/o mostrar eficacia en un ensayo que se va a considerar terapéuticamente eficaz; la prueba en múltiples, o todos, los modelos animales de dolor no es necesaria. En ciertos casos, las células madres y regenerativas derivadas de tejido adiposo se pueden ensayar en un ensayo de dolor que es relevante para uno o más tipos relacionados de dolor, o dolor relevante al tratamiento de una población de pacientes particular.

En ciertos casos, las células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares se pueden ensayar, por ejemplo, en un modelo inducido por ácido acético de dolor visceral. Este estudio se puede realizar, por ejemplo, administrando ácido acético por vía intraperitoneal en un volumen de dosis de aproximadamente 10 ml/kg a ratones, con vehículo o células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo (por ejemplo, 1×10^6 a 1×10^8) que se administran antes de la administración de ácido acético. Se registra el número de retorcimientos durante los 20 minutos posteriores después de descartar los primeros 5 minutos. Cada experimento contiene los siguientes grupos: vehículo + 2-5 dosis de células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo + control positivo; n = 10/grupo.

En ciertos otros casos, se puede ensayar una muestra de células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo utilizando el modelo de ligadura del nervio espinal de Chung cuyos nervios espinales L5 y L6 están fuertemente ligados, lo que da como resultado un dolor neuropático estable y duradero.

En ciertos otros casos, se puede ensayar una muestra de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares utilizando un ensayo de Taxol de neuropatía periférica en el que el dolor se desarrolla con el paso del tiempo en la rata después de la administración de una serie de inyecciones de Taxol.

En ciertos otros casos, se puede ensayar una muestra de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, usando el modelo de Bennet de dolor neuropático (alodinia), en el cual el dolor, inducido por la aplicación de ligaduras holgadas alrededor de uno de los nervios ciáticos, se muestra por la aguda retracción de la pata trasera afectada por los estímulos mecánicos ligeros.

En ciertos otros casos, se puede ensayar una muestra de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, usando un modelo de dolor inducido por administración de carragenano.

En ciertos otros casos, se puede ensayar una muestra de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, usando un modelo de adyuvante completo de Freund de dolor neuropático (por ejemplo, alodinia). Por ejemplo, pueden usarse cinco ratas por grupo, con una dosis inicial de, por ejemplo, 1×10^6 a 1×10^7 i.v., con una eficiencia determinada por reducción de de hiperalgesia de la pata trasera inducida por CFA. Se aplica la prueba t de Student para muestras independientes para la comparación entre el control de vehículo y los grupos tratados. Se pueden utilizar otros medicamentos para el dolor como controles positivos (mg/kg *per os*), por ejemplo, aspirina >100; ciclosporina A >100; dexametasona >30; gabapentina ~200; indometacina >10; o morfina 30.

En ciertos otros casos, se puede ensayar una muestra de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, utilizando fenilquinona (PQ) como un compuesto de generación de dolor, por ejemplo, utilizando cinco ratones por afección, una dosis inicial de, por ejemplo, 1×10^6 a 1×10^7 i.v., 1 h de pretratamiento, seguido de determinación de la reducción de retorcimiento inducido por PQ (2 mg/kg i.p.), durante un periodo de observación de 5 minutos.

En ciertos otros casos, se puede ensayar una muestra de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, utilizando un modelo de incisión de pata trasera de, por ejemplo, dolor post-operatorio.

En ciertos otros casos, se puede ensayar una muestra de células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células madre y regenerativas, y similares, usando un modelo de retirada de cola, en el que se evalúa la respuesta al estímulo de dolor de la retirada de cola antes y después de la administración de las células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo.

Los ensayos de dolor proporcionados en el presente documento son únicamente ejemplos no limitantes; se pueden utilizar también otros ensayos conocidos en la técnica.

Ejemplos

EJEMPLO 1

La esclerodermia es una enfermedad crónica caracterizada por depósitos excesivos de colágeno en la piel u otros órganos. La esclerodermia puede ser localizada o generalizada. La forma localizada de la enfermedad, en tanto que es incapacitante, tiende a no ser fatal. La forma generalizada de la enfermedad, que se manifiesta como esclerodermia difusa o esclerosis sistémica, puede ser fatal como resultado del daño al corazón, riñón, pulmón o intestinal. Los tres tipos de esclerodermia son esclerodermia difusa y esclerodermia limitada (síndrome CREST), que son esclerodermia sistémica, y morfea/lineal, que se limita a la piel. La esclerodermia difusa es la forma más grave, con victimas que experimentan un inicio rápido, endurecimiento de la piel generalizado, y daño a los órganos internos significativo, particularmente a los pulmones y el tracto gastrointestinal.

La forma limitada de esclerodermia es mucho más leve, que muestra un inicio y progresión más lentos. El endurecimiento de la piel por lo general se limita a las manos y la cara, la afección de los órganos internos es menos grave que en la forma difusa. Típicamente, el fenómeno de Raynaud puede preceder a la esclerodermia durante varios años. El fenómeno de Raynaud es debido a la vasoconstricción de las pequeñas arterias de periferias expuestas, particularmente las manos y los pies, al frío, y se caracteriza convencionalmente por un cambio de color trifásico-primero blanco, después azul y finalmente rojo en el recalentamiento. La forma limitada es a menudo denominada como síndrome CREST, donde "CREST" es un acrónimo para las cinco características principales, calcinosis (depósitos de calcio en los tejidos blandos, por ejemplo, la piel), síndrome de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilia (esclerodermia de los dedos), y telangiectasia (arañas vasculares).

Se realizó un ensayo clínico en humanos en el que se trataron 12 pacientes con esclerodermia (edad promedio 54,5 ± 10,3 años; intervalo 34-68 años) con células regenerativas derivadas de tejido adiposo. Todos los pacientes tenían un diagnóstico de esclerodermia con síndrome de Raynaud asociado con 14,3 ± 7,7 (media ± desviación estándar) duración de enfermedad (intervalo de 5 a 34 años).

Después del consentimiento informado y la finalización del valor inicial, evaluaciones de pretratamiento, el paciente se anestesió y se colocó en un campo estéril. Se creó un pequeño número de contraincisiones de 0,5 cm usando un bisturí de cuchilla 11. Se infiltró la solución tumescente que comprendía la solución de Ringer lactato complementada con xilocaína y adrenalina en el tejido subcutáneo a una relación de aproximadamente 1 volumen de solución con respecto a 1 volumen de tejido adiposo a aspirar.

Después de un tiempo suficiente para que la epinefrina induzca la vasoconstricción, el tejido adiposo se aspiró a través del mismo sitio de inyección utilizando una cánula de liposucción estilo Mercedes de 2 mm de diámetro (Mentor, Santa Barbara, CA). Se aspiraron aproximadamente 120 g de tejido adiposo. Después, el sitio de incisión se cerró con una sutura y se aplicó una banda de presión al área.

Las células derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas, se procesaron utilizando los métodos descritos en el presente documento. Entonces se diluyó la salida de 5 ml con una solución de lactato de Ringer a un volumen final de 10 ml (1 ml por dedo).

Se inyectaron las ADRC en el espacio subcutáneo y subdérmico por inyección a través de una cánula roma. Se realizaron dos inyecciones para cada dedo (una sobre cada lado del dedo de forma lateral a lo largo de la longitud del dedo; inyección de ~0,5 ml por lado). En primer lugar, se marcaron los sitios de inyección sobre ambas posiciones dorso-laterales de cada dedo y pulgar como se marca en la **figura 1**.

Se realizó una incisión en el primer sitio de inyección utilizando una aguja afilada (25G) como se muestra en la figura 2.

Después, se inserta una cánula roma en el sitio de incisión. Una jeringa de 1 ml fijada a la cánula se usó para administrar 1 ml de ADRC por dedo (0,5 ml en cada lado del dedo) como se muestra en la **figura 3.** A fin de realizar la inyección precisa se utilizó ampliación como fue necesario por el cirujano tratante.

El sitio de inyección se cerró entonces con un apósito seco y la inyección posterior se realizó como anteriormente hasta que se completaron las 20 inyecciones.

Evaluaciones

Los principales criterios de valoración para este estudio fueron: dolor (como se evaluó por una escala analógica visual; VAS), puntuación de gravedad de Raynaud, y dos evaluaciones amplias de la función de las manos; la puntuación de Cochin y el cuestionario de evaluación de salud de esclerodermia. Se realizaron antes del tratamiento

(valor inicial) y en intervalos después del tratamiento. Se proporcionan los datos en el presente documento para los puntos temporales de seguimiento de dos y seis meses.

1. Puntuación de gravedad de Raynaud

El síndrome de Raynaud es una afección dolorosa en la que los estímulos tal como el frío inducen vasoconstricción y pérdida de flujo sanguíneo en las extremidades, en particular, las puntas de los dedos. Después, va seguido de un periodo de isquemia severa por reperfusión y dolor significativo. Los pacientes con esclerodermia pueden tener múltiples episodios de Raynaud diarios con frecuencia que duran hasta una hora o más cada uno. La puntuación de Raynaud (RS) es una medición validada notificada reportada por el paciente de la gravedad de la enfermedad.

La RS promedio en el inicio fue de 28 ± 5 (media ± desviación estándar; intervalo de 20-34). Dos meses después del tratamiento, la RS mejoró a un promedio de 12 ± 8 (intervalo de 1,5-26). Este cambio fue estadísticamente significativo (p<0,001 por la prueba T pareada). Cada paciente mostró una mejora en la RS con respecto al periodo de tiempo de dos meses. En la **figura 4** se muestra un gráfico que muestra los datos para cada paciente junto con la media y la desviación estándar (línea en negrita) en dos meses. En la **figura 11** se muestra un gráfico que muestra los datos para el grupo combinado.

Los datos muestran además que todos los pacientes presentaron un mínimo de una mejora del 20 % en su puntuación de afección de Raynaud ("RCS"), como se muestra en la **figura 5**. A través de todos los pacientes, se observó una reducción del 53,7 % en la RCS a partir del inicio al mes 2 (p<,0001), y se alcanzó una reducción de 67,5 % en el mes 6 (p<,0001). Véase, la **figura 11.** Estos datos, así como los datos relacionados con el dolor de manos (VAS) y la capilaroscopía del lecho ungueal analizados más adelante demuestran que las células regenerativas derivadas de tejido adiposo descritas en el presente documento son útiles en la mejora de manifestaciones vasculares de la esclerodermia.

2. Dolor

El dolor es un problema frecuente para pacientes con esclerodermia. Éste surge a partir del síndrome de Raynaud, la presencia de ulceras digitales, y otros factores tal como la rigidez e intervalo limitado de movimiento de la mano.

El dolor se evaluó utilizando una escala analógica visual estándar en la que los pacientes notificaron su sentido de su dolor actual en una escala de uno a 100, por ejemplo, colocando una marca en una línea de 100 mm. Ésta es una herramienta ya validada, muy ampliamente utilizada para evaluar el dolor en un amplio arreglo de afecciones clínicas que incluyen esclerodermia.

El dolor promedio en el inicio fue de 59,4 ± 17,2 (media ± desviación estándar; intervalo de 20-80). Dos meses después del tratamiento, la puntuación del dolor mejoró a un promedio de 21,6 ± 17,5 (intervalo de 0-40). Este cambio fue estadísticamente significativo (p<0,001 por la prueba T pareada). En la **figura 11** se proporcionan los datos colectivos para los 12 pacientes.

Un estudio de la relevancia de los cambios en el dolor evaluado utilizando la herramienta VAS mostró que una puntuación de 0-4 mm se puede evaluar como "sin dolor", 5-44 mm como "dolor leve", 45-75 como "dolor moderado", y 75-100 como "dolor grave". Mediante estos criterios hubo dos pacientes con dolor grave antes del tratamiento; ninguno después del tratamiento en realidad, ambos pacientes con dolor grave antes del tratamiento no mostraron dolor en los dos meses después del tratamiento. Mediante los mismos criterios hubo nueve pacientes que mostraron dolor moderado antes del tratamiento pero sólo uno a los dos meses. Once de 12 pacientes (92 %) evaluados a los dos meses tuvieron solamente dolor leve o ningún dolor en comparación con un único paciente (8 %) en el inicio. El mismo estudio de la herramienta VAS indicó que un cambio en dolor del 33 % es clínicamente significativo para el paciente. Nueve de 12 pacientes (75 %) tratados mostraron una disminución en el dolor de al menos el 33 %.

3. Cuestionario de evaluación de salud

Las patologías tal como la esclerodermia, afectan significativamente en la salud general y la calidad de vida de los pacientes. El cuestionario de evaluación de salud de esclerodermia (SHAQ) es una herramienta validada y bien establecida para evaluar la salud en pacientes con esclerodermia.

La salud se evalúa utilizando un SHAQ estándar. La puntuación promedio en el inicio fue de 1,28 ± 0,31 (media ± desviación estándar; intervalo de 0,8-1,9). Dos meses después del tratamiento, la puntuación del SHAQ promedio mejoró a un promedio de 0,66 ± 0,56 (intervalo de 0-1,5). Este cambio fue estadísticamente significativo (p<0,001 por la prueba T pareada). A continuación se muestra un gráfico que muestra los datos para cada paciente junto con la media y la desviación estándar (línea en negrita).

Los estudios han mostrado que un cambio en la puntuación en este tipo de ≥0,2 es sintomáticamente significativo para el paciente. La mejora promedio observada en este estudio fue de 0,6. Además, 10 de 12 pacientes mostraron una mejora en SHAQ de más de 0,2. La mejora promedio en SHAQ en este grupo fue de 0,75 ± 0,35 (intervalo de 0,3 a 1,3). En las **figuras 6** y **7** se presentan los datos a los dos meses. A modo de comparación, un ensayo clínico de 281 pacientes de iloprost, un fármaco intravenoso aprobado en la Unión Europea para el tratamiento de esclerodermia, la mejora media en el SHAQ general fue de 0,23 ± 0,64. Se observó una mejora del 45,2 % en el estado de salud percibido del paciente en 2 meses (p = 0,001), y se observó una mejora del 42,4 % en el estado de salud percibido del paciente en 6 meses, como se evalúa por un gráfico que muestra los datos del mes 6 que se proporciona en la **figura 11**.

Como se muestra en la **figura 11,** la mayoría de los pacientes mostró mejoras importantes en la puntuación SHAQ. El SHAQ también se puede considerar como un marcador útil de cambio en el estado de la SSc en la práctica clínica debido a que una mejora en el HAQ está asociada con una mejora en la evaluación global del médico. Este aspecto global indica la capacidad de la intervención para aplicar beneficio a los pacientes en regiones distales al sitio de tratamiento (manos) y es consistente con los informes del paciente de mejora en los síntomas de esclerodermia en la cara y otras áreas. Estos datos demuestran que las células regenerativas derivadas de tejido adiposo divulgadas en el presente documento son útiles para la mejora prolongada (por ejemplo, más de 6 meses) en el estado de salud total y general de los sujetos con esclerodermia.

4. Las ADRC mejoran la discapacidad en las manos: Escala de Cochin, fuerza de agarre, fuerza de pellizco, indicio de Kapandji, distancia de esquinas, y movilidad de los dedos.

La escala funcional de las manos de Cochin ("CHFS") es una medición notificada por el paciente ampliamente utilizada, validada de la función de las manos. Esta herramienta evalúa la capacidad del paciente para realizar las tareas diarias con sus manos tal como abrochar botones y cremalleras y preparar la comida.

La función de las manos se evaluó usando la herramienta de Cochin. La puntuación promedio en el inicio fue de 48,5 ± 11,0 (media ± desviación estándar; intervalo de 30-69). Dos meses después del tratamiento, la puntuación de Cochin promedio mejoró a un promedio de 25,5 ± 16,5 (intervalo de 2-48). Este cambio fue estadísticamente significativo (p<0,001 por la prueba T pareada). En la **figura 8** se muestra un gráfico que muestra los datos de dos meses para cada paciente junto con la media y la desviación estándar (línea en negrita). Se observó una disminución del 47,4 % (p<0,001) y del 56,0 % (p <0,001) en CHFS en comparación con el valor inicial a los 2 y 6 meses después del tratamiento, respectivamente. Los datos se presentan en la **Tabla 1**, más adelante. En la **figura 11** se representan gráficamente los datos CHFS de 2 y 6 meses.

La mejora de la función de las manos como se evalúa mediante la CHFS también se asoció con un aumento significativo en la fuerza de las manos y la primera distancia de esquina. La fuerza de agarre se evaluó por la puntuación Jamar aceptada en la técnica. Véase, Schmidt, et al. (1970), Arch Phys Med Rehabil. 51: 321-7. La fuerza de agarre aumentó en el mes 6, en comparación con el valor inicial, con una media de + 4,8 (± 6,4) kg para la mano dominante (p = 0,033) y + 4,0 (± 3,5) kg para la mano no dominante (p = 0,033). Además, se observó un aumento significativo de la puntuación de la fuerza de pellizco en el mes 6. De forma específica, la fuerza de pellizco mejoró con una media de +1,0 (±1,1) kg para la mano dominante (p = 0,009), y +0,8 (± 1,2) kg, para la mano no dominante (p= 0,050).

Los sujetos mostraron una función de las manos mejorada como se evalúa por la medición de la primera distancia de esquina, así como la suma de la 2ª, 3ª y 4ª distancia de esquina, en milímetros. Los sujetos también mostraron una mejora significativa de la flexión de los dedos, como se mide por la distancia de la yema de los dedos a la línea palmar distal. Los datos se presentan en la **Tabla 1**, a continuación.

TABLA 1: EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN DE LAS MANOS

	Valor inicial	2 meses	Valor de	6 meses	Valor de

			p*		p**
CHFS total Media (DE)	48,5 (± 10,8)	25,8 (±17,0)	**p = 0,001**	21,2 (± 15,4)	p **<,001**
Puntuación Jamar (kg) Mano no dominante Media (DE) Mediana (intervalo)	14,9 (± 6,1) 14,0 [11,0 - 19,0]	17,5 (± 7,8) 18,5 [14,0 - 21,5]	**p = 0,006**	17,6 (± 8,0) 20,0 [11,0 - 23,0]	**(W) p = 0,002**
Puntuación Jamar (kg) Mano dominante Media (DE) Mediana (intervalo)	16,0 (± 5,8) 15,0 [12,0 - 18,0]	17,9 (± 7,3) 18,5 [14,0 - 23,0]	**p = 0,072 (NS)**	19,4 (± 7,4) 20,0 [14,0 - 25,5]	**p = 0,033**
Puntuación de pellizco (kg) Mano no dominante Media (DE)	1,3 (± 0,9)	2,2 (± 0,7)	**p = 0,071 (NS)**	2,1 (± 1,0)	**p = 0,050**
Puntuación de pellizco (kg) Mano dominante Media (DE)	1,3 (± 1,1)	2,0 (± 0,8)	p = **0,199 (NS)**	2,3 (± 1,3)	p **= 0,009**
Puntuación de Kapandji /10 Mano no dominante Media (DE) Mediana (intervalo)	8,5 (± 1,2) 9,0 [8,0 - 9,5]	8,4 (± 1,6) 9,0 [8,0 - 9,5]	**(W) p = 1,000 (NS)**	8,8 (± 1,3) 9,0 [8,0 - 9,8]	**(W) p = 0,187 (NS)**
Puntuación de Kapandji /10 Mano dominante Media (DE) Mediana (intervalo)	8,0 (± 1,4) 8,0 [7,0 - 9,0]	8,3 (± 1,6) 9,0 [7,5 - 9,5]	**p = 0,380 (NS)**	8,4 (± 1,7) 9,3 [7,3 - 9,5]	**p = 0,111 (NS)**
1ª distancia de esquina (mm) Mano no dominante Media (DE)	115,8 (± 24,5)	122,3 (± 20,9)	**p = 0,042**	132,8 (± 28,0)	**p = 0,002**
1ª distancia de esquina (mm) Mano dominante Media (DE)	105,6 (± 24,7)	112,9 (± 29,2)	**p = 0,010**	118,9 (± 31,2)	**p = 0,002**
Suma de distancias de esquina (mm) Mano no dominante Media (DE)	132,1 (± 24,6)	133,7 (± 29,4)	**p = 0,052 (NS)**	137,9 (± 27,0)	**p <,001**
Suma de distancias de esquina (mm) Mano dominante Media (DE)	133,9 (± 18,5)	131,2 (± 20,7)	**p = 0,822**	140,2 (± 26,6)	**p = 0,073 (NS)**
Suma de distancia yema/DPL (mm) Mano no dominante Media (DE)	48,1 (± 54,5)	46,8 (± 52,0)	**p = 0,830 (NS)**	37,8 (± 43,0)	**p = 0,109 (NS)**
Suma de distancia yema/DPL (mm) Mano dominante Media (DE)	52,0 (± 46,5)	47,3 (± 43,8)	**p = 0,395 (NS)**	43,9 (± 42,7)	**p = 0,111 (NS)**

*Valor de p del inicio a M2,

**Valor de p del inicio a M6

CHFS = Escala funcional de las manos de Cochin

DPL= Línea palmar distal

Media dada cuando p se calculó con la prueba de Wilcoxon

5. Las ADRC mejoran las manifestaciones vasculares de la esclerodermia

Las úlceras digitales son relativamente comunes en pacientes con esclerodermia. Cinco de los doce pacientes en este estudio tenía úlceras digitales en el inicio. La curación de las úlceras digitales se apreció en las visitas de seguimiento a los 2 y 6 meses. Los datos se presentan en la **Tabla 2**, a continuación.

TABLA 2: RESULTADO DE LAS ÚLCERAS DIGITALES

	N.º de DU en el inicio	N.º de DU a los 2 meses	N.º de DU a los 6 meses
Paciente 1			
Mano no dominante	1	1	0
Mano dominante	0	0	0
Paciente 3			
Mano no dominante	1	0	0
Mano dominante	4	0	1
Paciente 4			
Mano no dominante	0	0	1
Mano dominante	5	7	3
Paciente 7			
Mano no dominante	1	0	1
Mano dominante	1	0	1
Paciente 10			
Mano no dominante	1	1	1
Mano dominante	1	1	0

Las manifestaciones vasculares de la esclerodermia también se pueden evaluar utilizando la prueba de microscopía capilar del lecho ungueal, por ejemplo, como se describe en Lee, et al. (1983) J. Rheumatol. 10:930-938. En esta prueba, se miden los siguientes parámetros: (1) el número de bucles capilares/dedo; (2) la presencia o ausencia de sedimento; (3) el número de bucles capilares ampliados (más de 4 veces el aferente normal, transición, y ancho de miembro eferente); (4) número de bucles capilares gigantes/dedo (10 veces o más el ancho normal de los miembros capilares; y (5) puntuación avascular. Para la puntuación avascular, cada dedo se clasificó de 0 a 3, con 0 = sin área vascular; 1 = 1-2 áreas avasculares discretas; 2 = >2 áreas avasculares discretas; 3 = áreas avasculares extensas y confluentes. Los datos de 2 y 6 meses se presentan en la Tabla 3, a continuación.

TABLA 3: EFECTOS DE LA INYECCIÓN DE CÉLULAS REGENERATIVAS DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO AUTÓLOGAS SOBRE LAS MANIFESTACIONES VASCULARES

	Valor inicial	**2 meses**	**Valor de p***	**6 meses**	**Valor de p****
Puntuación de afección de Raynaud					
(**RCS**) Media (DE)	7,1 (± 1,2)	3,2 (± 1,7)	**p <,001**	2,2 (± 1,5)	**p <,001**
VAS de la mano/100					
Media (DE)	59,4 (± 17,2)	21,6 (± 17,5)	**p = 0,001**	17,8 (± 15,3)	**p <,001**
Datos de capilaroscopia					
Número de bucles capilares					
Mano no dominante					

Media (±DE)	32,2 (± 20,9)	28,4 (± 17,4)		30,5 (± 18,9)	
Media (intervalo)	30,0 [15,0 - 48,0]	25,0 [15,0- 41,0]	**(W) p = 0,031**	30,0 [16,0 -	**(W) p = 0,413**
Mano dominante				43,5]	
Media (±DE)	27,3 (± 18,6)	24,8 (± 16,8)		27,7 (±17,1)	
Media (intervalo)	25,5 [11,5 - 39,0]	20,5 [13,0 - 32,0]	**(W) p = 0,077**	25,0 [15,0 - 37,5]	**(W)** p = 0,762
Número de capilares gigantes					
Mano no dominante					
Media (±DE)	4,3 (± 4,8)	3,6 (± 5,0)		3,6 (± 5,2)	
Media (intervalo)	3,0 [0,0 - 6,0]	2,0 [0,0 - 5,0]	**(W) p = 0,006**	2,0 [0,0 - 4,0]	**(W) p = 0,068**
Mano dominante					
Media (±DE)	4,1 (± 5,3)	3,6 (± 4,4)		3,1 (± 4,3)	
Media (intervalo)	2,0 [0,0 - 7,0]	2,0 [1,0 - 5,0]	**(W) p = 0,325**	1,0 [0,0 - 4,0]	**(W) p = 0,017**
Número de capilares distróficos					
Mano no dominante					
Media (±DE)	4,4 (± 5,8)	2,2 (± 2,7)		1,9 (± 2,5)	
Media (intervalo)	2,0 [0,0 - 7,0]	1,0 [0,0 - 3,0]	**(W) p = 0,003**	1,0 [0,0-3,0]	**(W) p = 0,003**
Mano dominante					
Media (±DE)	4,7 (± 6,7)	2,6 (± 3,6)		2,2 (± 2,8)	
Media (intervalo)	2,0 [0,0 - 6,5]	1,0 [0,0 - 4,0]	**(W) p = 0,002**	1,0 [0,0- 3,5]	**(W) p = 0,002**
Puntuación de supresión vascular					
Mano no dominante					
Media (±DE)	1,6 (± 0,7)	1,5 (± 0,7)	**p = 0,031**	1,3 (± 0,7)	**p = 0,003**
Mano dominante					
Media (±DE)	1,7 (± 0,8)	1,6 (± 0,6)	**p = 0,656**	1,5 (± 0,7)	**p = 0,010**

*Valor de p del inicio a M2,

**Valor de p del inicio a M6

Media dada cuando p se calculó con la prueba de Wilcoxon

Los datos anteriores indican que las ADRC mejoran las manifestaciones vasculares de la esclerodermia.

6. Las ADRC mejoran la esclerodactilia y la fibrosis

También se observó una mejora significativa en la esclerodactilia y la fibrosis

La puntuación cutánea de Rodnan modificada (MRSS) es la prueba más ampliamente utilizada para evaluar el espesor de la piel dérmica, y es una medición sustituta reconocida en la técnica de la gravedad de la enfermedad y el riesgo de mortalidad en pacientes con esclerosis sistémica cutánea difusa: un aumento en el engrosamiento de la piel está asociado con la afección de órganos internos y tasas de mortalidad aumentadas. Además, una mejora en la puntuación del espesor de la piel está asociada con un resultado más favorable. Véase, Czirjak, et al. (2008) Rheumatolology 47 (supl. 5): 44-45. El área superficial de la piel total se divide de forma arbitraria en 17 áreas diferentes: dedos, manos, antebrazos, brazos, pies, piernas, y muslos (en pares), y rostro, pecho, y abdomen. En cada una de estas áreas, la puntuación cutánea se evalúa mediante palpación manual. La puntuación cutánea es 0 para piel no afectada, 1 para engrosamiento leve, 2 para engrosamiento moderado, y 3 para engrosamiento grave (piel rígida). La puntuación cutánea total es la suma de las puntuaciones cutáneas de las áreas individuales, siendo la puntuación máxima posible 51. La puntuación cutánea tiende a correlacionarse con el grado de fibrosis dérmica, que a su vez se correlaciona con el grado de fibrosis y disfunción de los órganos internos, tal como fibrosis pulmonar, enfermedad del corazón por esclerodermia, enfermedad renal, y afección gastrointestinal.

No se observó ningún cambio significativo de la MRSS enfocada en las manos desde el valor inicial al mes 2 o el mes 6. Sin embargo, se observó una reducción de al menos el 25 % de la MRSS en 4 pacientes, apreciando reblandecimiento de la piel en la parte dorsal de la mano. La MRSS global disminuyó significativamente desde el valor inicial (media ± DE 13,9 ± 9,8) al mes 2 (11,7 ± 9,8; p = 0,010), y al mes 6 (11,5 ± 10,1; p = 0,013). 5 pacientes mostraron una reducción de al menos el 25 % en la MRSS global en el mes 6. Los datos se presentan en la **Tabla 4**, a continuación.

El diámetro de los dedos, medido como talla de anillo, también es un indicador de cambios del tejido suave de los dedos en la esclerodermia. Véase, Serup, J. (1985) Dermatology 171: 41-44. Se observó una mejora significativa en el diámetro de los dedos, medido como talla de anillo, en pacientes en el mes 2 y 6, en comparación con el valor inicial. Los datos se presentan en la **Tabla 4**. Los datos sugieren que el tratamiento con células regenerativas derivadas de tejido adiposo como se divulga en el presente documento puede conducir a una mejora en el edema de la piel.

TABLA 3: EFECTO DE LA INYECCIÓN DE ADRC EN LA ESCLERODACTILIA Y LA FIBROSOS DE LAS MANOS

	Valor inicial	**2 meses**	**Valor de p***	**6 meses**	**Valor de p****
Diámetro medio de F1-F5 (talla del anillo) Mano no dominante Media (DE)	60,7 (± 2,3)	59,3 (± 1,7)	**p = 0,010**	58,1 (±2,2)	**p <,001**
Diámetro medio de F1-F5 (talla del anillo) Mano dominante Media (DE)	61,9 (± 2,2)	60,7 (± 2,3)	**p = 0,013**	59,8 (± 2,4)	**p <,001**
MRSS aplicada a la mano/18 Mediana (intervalo)	10,9 (± 4,9)	10,0 (± 5,3)	p = **0,067 (NS)**	9,9 (± 6,0)	**p = 0,246 (NS)**
MRSS global/51 Media (DE)	13,9 (± 9,8)	11,7 (± 9,8)	**p = 0,010**	11,5 (± 10,1)	**p = 0,013**

*Valor de p del inicio al mes 2

**Valor de p del inicio al mes 6

MRSS = Puntuación de la piel Rodnan modificada

Los pacientes también notificaron una mejora de los síntomas sistémicos de su enfermedad, es decir, una mejora en los síntomas en ubicaciones anatómicas distales al sitio de tratamiento (los dedos).

Paciente A: Citas

Paciente: Después del tratamiento, como le dije, tuve la sensación de que me dieron 10 nuevos dedos. Ya no tengo más las mismas sensaciones que antes. Siento mucha más flexibilidad; ya no tengo tanto dolor, ni tanto dolor tipo eléctrico en mis manos, en mis antebrazos y en mis hombros. Mis dedos están menos azules en comparación cuando tenía el síndrome de Raynaud. Mis dedos aún están un poco blancos pero estoy mucho más activo que antes. Puedo hacer lo que sea de forma natural (sin darme cuenta) sin dolor. Estoy muy feliz. Sin embargo, en mi mano derecha, aún siento algo de "pesadez" y mis dedos aún están un poco hinchados en comparación con mi mano izquierda.
Doctor: Entonces, ¿cuáles son los cambios en su vida diaria?
Paciente: Todo ha cambiado. Antes, no era capaz de enderezar o secar mi mano; no era capaz de escribir una letra, no era capaz de abrir una lata, de pelar verduras o de cortar carne, de limpiar los platos, de maquillarme... Había una gran cantidad de cosas que no era capaz de hacer como pintar, coser... pero ahora puedo hacer cualquier cosa de forma natural y sin darme cuenta.

Paciente B: Citas

Paciente: No era capaz de utilizar mi mano. Solía cortar carne de esa forma. No era capaz de cortar carne.
Doctor: Y, ¿ahora?
Paciente: Ahora, puedo hacer cualquier cosa, puedo utilizar el teclado, ya no tengo esa sensación eléctrica en las puntas de los dedos. Antes, tenía dolor y esa sensación "eléctrica" en las puntas de los dedos.
Doctor: Doctor: ¿Qué clase de dolor tenias en las puntas de los dedos?
Paciente: Era como un dolor tipo eléctrico, solía sentir constantemente ese dolor eléctrico en todos lados.

Otras citas:

Mis dedos recuperaron su color normal por primera vez en 5 años.
Ya no siento dolor, en absoluto.
Ya no siento frío, dejé de usar guantes todo el tiempo.
Puedo cortar la carne de mis hijos y cepillarme el pelo, he vuelto a una vida normal.
He regresado al trabajo [secretaria].

Estos datos demuestran que las células derivadas de tejido adiposo divulgadas en el presente documento son útiles para tratar dolor y fibrosis, por ejemplo, en sujetos con esclerodermia. En particular, los datos demuestran que las células regenerativas derivadas de tejido adiposo divulgadas en el presente documento son útiles para mejorar la función vascular y la fibrosis en sujetos con esclerodermia.

EJEMPLO DE REFERENCIA 2

Tratamiento de dolor neuropático utilizando células derivadas de tejido adiposo

El dolor crónico, por ejemplo, el dolor neuropático, una afección que afecta al menos al 30 % de los americanos, es causado, por ejemplo, por trastornos del sistema nervioso, también conocido como neuropatía, y puede estar acompañado de, o causado por, daño tisular, que incluye fibras nerviosas que se dañan, disfunción o lesión. El dolor neuropático también se puede causar, por ejemplo, por lesiones patológicas, procesos de neurodegeneración, o disfunción prolongada de partes del sistema nervioso periférico o central. Sin embargo, el dolor neuropático también puede estar presente cuando no es evidente el daño tisular discernible.

La neuropatía es una recopilación de trastornos que se presentan cuando se dañan los nervios del sistema nervioso periférico (la parte del sistema nervioso fuera del cerebro y la medula espinal). La afección se denomina en general como neuropatía periférica, y es más comúnmente debido al daño a los axones del nervio. La neuropatía provoca por lo general dolor y entumecimiento en las manos y pies. Puede ser resultado a partir de lesiones traumáticas, infecciones, trastornos metabólicos, y exposición a toxinas. Una de las causas más comunes de neuropatía es la diabetes. La neuropatía puede afectar a los nervios que controlan el movimiento muscular (nervios motores) y aquellos que detectan las sensaciones tal como frialdad o dolor (nervios sensoriales). En algunos casos - neuropatía autonómica - puede afectar órganos internos, tal como el corazón, vasos sanguíneos, vejiga, o intestinos.

Por lo tanto, se describe en el presente documento un método de tratamiento de un individuo que tiene dolor crónico que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende

ADRC. En un caso específico, el dolor crónico, por ejemplo dolor neuropático, es, o se provoca por, neuritis (por ejemplo, polineuritis, neuritis branquial, neuritis óptica, neuritis vestibular, neuritis craneal, o neuritis por arsénico), diabetes mellitus (por ejemplo, neuropatía diabética), neuropatía periférica, síndrome de distrofia simpática refleja, dolor del miembro fantasma, dolor después de la amputación, neuralgia postherpética, herpes zóster, síndrome de dolor central (dolor causado, por ejemplo, por daño al cerebro, medula espinal y/o tronco cerebral), síndrome de guillain-Barre, enfermedad degenerativa del disco, cáncer, esclerosis múltiple, trastornos renales, alcoholismo, neuropatía relacionada con el virus de inmunodeficiencia humana, neuropatía sensorial migratoria de Wartenbergh, síndrome de fibromialgia, causalgia, lesión de la medula espinal, o exposición a un agente químico, por ejemplo, tricloroetileno o dapsona (diaminil-difenil sulfona). En casos específicos, la neuropatía periférica es mononeuropatía (daño a un solo nervio periférico); polineuropatía (daño a más de un nervio periférico, frecuentemente situada en diferentes partes del cuerpo), mononeuritis múltiple (daño simultaneo o secuencial a troncos nerviosos no contiguos), o neuropatía autonómica. La neuropatía periférica, por ejemplo, mononeuritis múltiple, se puede causar por, por ejemplo, diabetes mellitus, vasculitis (por ejemplo, poliartritis nodosa, granulomatosis Wegener, o síndrome de Churg-Strauss), artritis reumatoide, lupus eritematoso (SLE), sarcoidosis, una amiloidosis, o crioglobulinemia.

Se pueden evaluar los niveles de dolor neuropático, por ejemplo, mediante la escala analógica visual (VAS). La escala numérica de intensidad de dolor, escala de clasificación gráfica, escala de clasificación verbal, escala de rostros de dolor (escala de dolor de rostros), escalas numéricas de angustia y de dolor e intensidad de dolor, breve inventario de dolor (BPI), evaluación de dolor memorial, puntuación de dolor de principio de selección de Alder Hey, cuestionario de dolor de Dallas, índice de dolor con dolorímetro (DPI), escala de rostro, piernas, actividad, llanto, capacidad de consuelo, escala de Lequesne, cuestionario de dolor de McGill (MPQ), escala de descriptor diferencial (DDS), escala de discapacidad y dolor de cuello (NPAD), cuadro numérico de 11 puntos (BS-11), cuestionario de dolor de espalda de Roland-Morris, o la escala de clasificación de dolor Wong-Baker FACES. Una mejora después de la administración de la composición al individuo en una o más de estas evaluaciones de dolor se considera terapéuticamente eficaz.

La composición, por ejemplo, se puede administrar por vía local, distal de un sitio de dolor neuropático, a un nervio o conjunto de nervios que se ocupan de un área dañada del cuerpo de un individuo, por ejemplo, un área en el cuerpo en la que el individuo experimenta el dolor neuropático. Por ejemplo, la composición se puede administrar a lo largo de la espina en cualquier punto en el que los troncos nerviosos emergen de la columna vertebral, por ejemplo, cualquiera de los nervios cervicales, nervios torácicos, y nervios lumbares. En casos específicos, la composición puede administrarse adyacente a la médula espinal en cuyo punto los nervios emergen en C1, C2, C3, C4, C5, C6, or C7, or T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11 o T12, o L1, L2, L3, L4 o L5, o en el sacro.

Modelo in vivo para el tratamiento de dolor neuropático con composiciones que comprenden células derivadas de tejido adiposo

A continuación se encuentra un modelo de rata para mononeuropatía crónica, periférica dolorosa

La mononeuropatía periférica se induce de forma quirúrgica en ratas como se indica a continuación. Las ratas se anestesian con pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p.). El nervio ciático común se expone al nivel de la mitad del muslo mediante disección roma a través del bíceps femoral. Proximal a la trifurcación del nervio ciático, se liberan aproximadamente 7 mm de nervio de tejido adherido y se atan 4 ligaduras (hilo crómico 4,0) de forma holgada alrededor del mismo con aproximadamente 1 mm de separación. La longitud del nervio afectado de esta forma es de 45 mm de largo. Las ligaduras se atan de tal forma que el diámetro del nervio se ve que está apenas oprimido cuando se ve con aumento de 40x. El grado deseado de constricción retrasa, pero no detiene, la circulación a través de la vasculatura epineureal superficial. La incisión se cierra en capas. En cada animal, se realiza una disección idéntica en el lado opuesto, excepto que el nervio ciático no se liga. Se utilizan grupos de ratas de control, en los que algunas ratas no se operan y otras reciben procedimientos simulados bilaterales (exposición de la ciática sin ligación).

Cada grupo se trata posteriormente con ADRC o con placebo. Se inspeccionan los animales cada 1 o 2 días durante los primeros 14 días después de la operación y en aproximadamente intervalos semanales después de la misma. Durante estas inspecciones, cada rata se coloca sobre una mesa y se observa cuidadosamente durante 1-2 minutos. Se realizan observaciones de la marcha del animal, la postura de la pata trasera afectada, la condición de la piel de la pata trasera, y el grado, si está presente, de autotomía. Se presta atención particular a la condición de las garras debido a que la autotomía que implica daño tisular directo se puede indicar por las puntas de las garras roídas. Se observa el comportamiento después de la operación, después de la administración, que incluye apetito y respuestas hiperalgésicas a calor radiante nocivo y dolor quimiogénico.

Evaluación de respuesta a calor nocivo

Se colocaron las ratas por debajo de una jaula de plástico transparente, invertido (18 x 28 x 13 cm) sobre un suelo elevado de vidrio de ventana. Una fuente de calor radiante por debajo del suelo de vidrio apunta a la pata trasera plantar. El inicio del estímulo activa un temporizador controlado por una fotocelda colocada para recibir luz reflejada de la pata trasera. El reflejo de la retirada de la pata trasera interrumpe la luz de la fotocelda y detiene automáticamente el temporizador. Se miden latencias a lo más cercano de 0,1 segundos. Se prueban las patas traseras de forma alternativa con intervalos de 5 minutos entre pruebas consecutivas. Se toman cinco mediciones de latencia para cada pata trasera en cada sesión de prueba. Las 5 latencias por lado se promedian y se calcula una puntuación de diferencia restando la latencia promedio del lado de control de la latencia promedio del lado ligado. Se comparan las puntuaciones de diferencia para cada grupo de tratamiento.

EJEMPLO DE REFERENCIA 3

Tratamiento de fibrosis no localizada usando células derivadas de tejido adiposo que comprenden células regenerativas

La quimioterapia a menudo está asociada con fibrosis generalizada. Esta observación clínica se ha extendido a un modelo animal en el que se administran agentes tal como bleomicina de forma local o sistémica para inducir fibrosis como se evidencia por un aumento significativo en el espesor de la piel (que se puede medir mediante evaluación histológica). En dicho modelo se inyecta bleomicina en la piel de los ratones. La administración local o sistémica (por ejemplo: intravascular) de las ADRC a los ratones tratados con bleomicina conduce a una disminución en el espesor de la piel y a la mejora en la vascularidad en el área tratada que indica fibrosis reducida.

Específicamente, se administra bleomicina (0,1 ml; 300 µg/ml) a los ratones mediante inyección subcutánea en la región inter-escapular y en ambos costados utilizando una aguja de calibre 26, durante 7 días por semana durante 4 semanas consecutivas. Una semana después de la finalización de la lesión con bleomicina los ratones se tratan con ADRC. Se evalúa la fibrosis de la piel mediante análisis histológicos 5 y 13 semanas después de la inyección de BLM. Los resultados muestran que el tratamiento con ADRC corrige la lesión dérmica inducida mediante bleomicina de tal forma que el espesor dérmico era indistinguible de aquel de la piel no lesionada, normal. De forma similar, el tratamiento con ADRC está asociado con un aumento significativo en la vascularidad.

De forma similar, la administración de bleomicina de forma sistémica o por inhalación es un modelo de fibrosis pulmonar. El tratamiento de animales lesionados de esta forma con ADRC puede conducir a fibrosis reducida y la mejora consecuente en la función pulmonar.

REIVINDICACIONES

1. Una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo para su uso en el tratamiento de esclerodermia en un sujeto que lo necesite, en la que el tratamiento de esclerodermia comprende tratamiento del fenómeno de Raynaud o supresión del color del fenómeno de Raynaud.

2. La cantidad terapéuticamente eficaz de células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el tratamiento de la esclerodermia comprende el tratamiento del fenómeno de Raynaud.

3. La cantidad terapéuticamente eficaz de células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el tratamiento de esclerodermia comprende la supresión del dolor del fenómeno de Raynaud.

4. La cantidad terapéuticamente eficaz de células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en la que la esclerodermia se limita a esclerodermia o esclerodermia difusa.

5. La cantidad terapéuticamente eficaz de células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que las células comprenden además un aditivo.

6. La cantidad terapéuticamente eficaz de células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que las células derivadas de tejido adiposo se aplican junto con tejido.

7. La cantidad terapéuticamente eficaz de células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que las células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo se forman para su inyección directa en los dedos del sujeto.

8. La cantidad terapéuticamente eficaz de células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que las células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo se formulan para inyección intravenosa.

9. La cantidad terapéuticamente eficaz de células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que las células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo se formulan para administración en múltiples dosis.

10. La cantidad terapéuticamente eficaz de células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que las células se administrarán al sujeto que lo necesite sin cultivar las células antes de administrarlas al sujeto.

11. La cantidad terapéuticamente eficaz de células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que al menos una porción de las células derivadas de tejido adiposo se conserva criogénicamente.

12. La cantidad terapéuticamente eficaz de células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que las células se extraen del tejido adiposo de la persona a la que se van a implantar.

13. La cantidad terapéuticamente eficaz de células madre y regenerativas derivadas de tejido adiposo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que las células son alogénicas a la persona a la que se van a administrar.

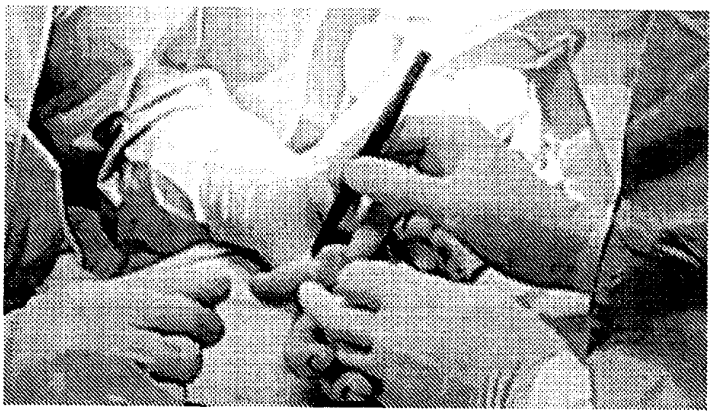


FIG. 1

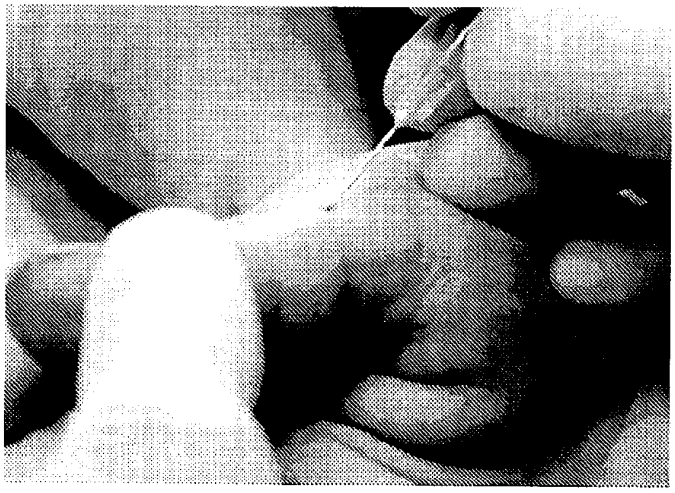


FIG. 2

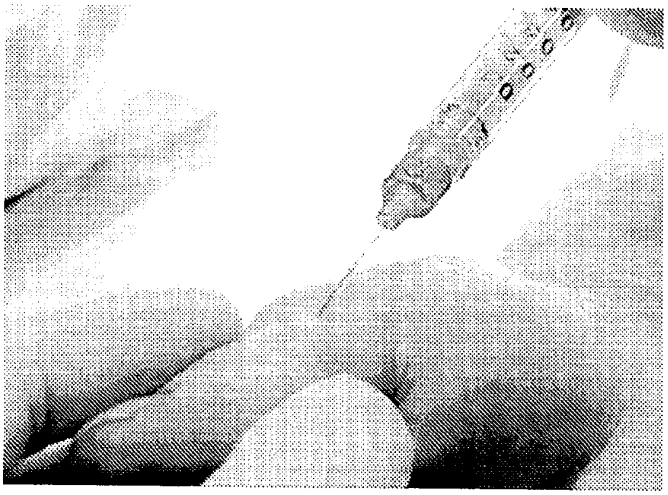


FIG. 3

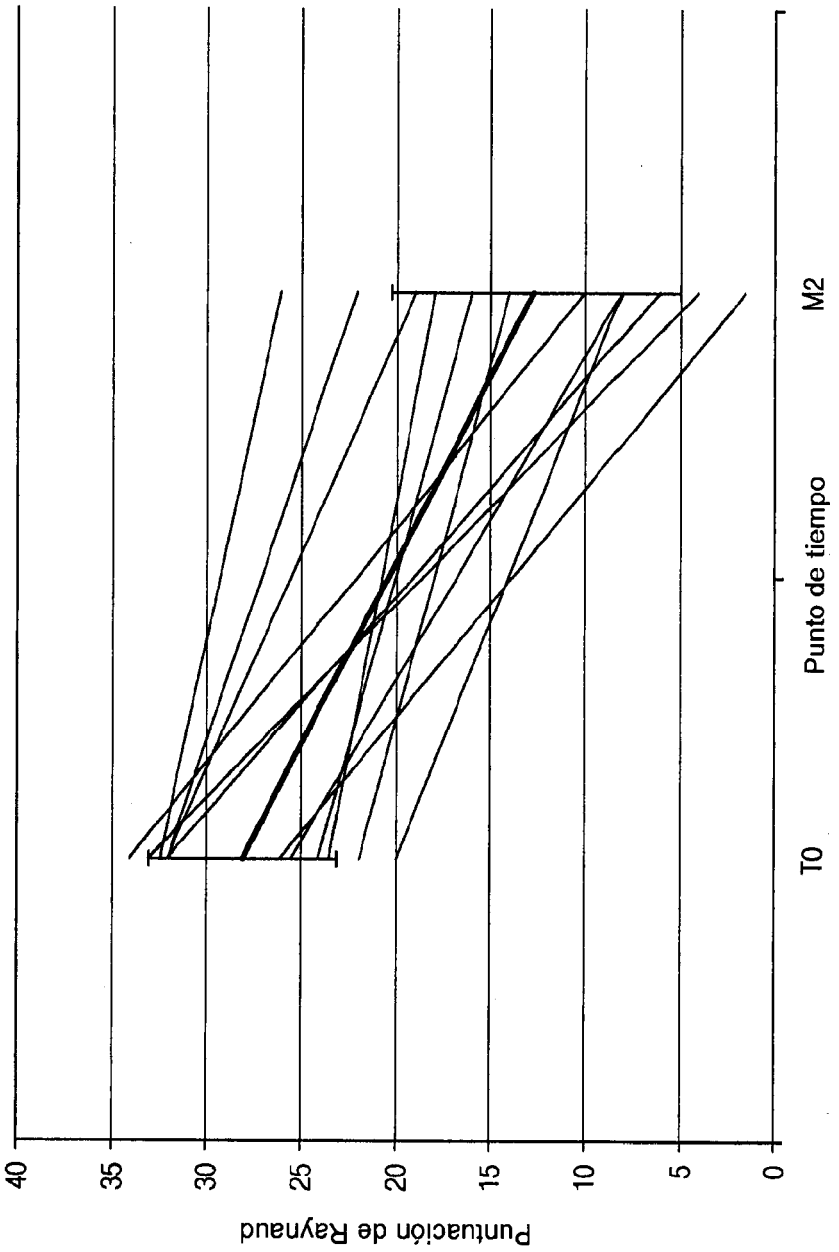

Puntuación de Raynaud
40
35
30
25
20
15
10
5
0
T0
Punto de tiempo
M2

FIG. 4

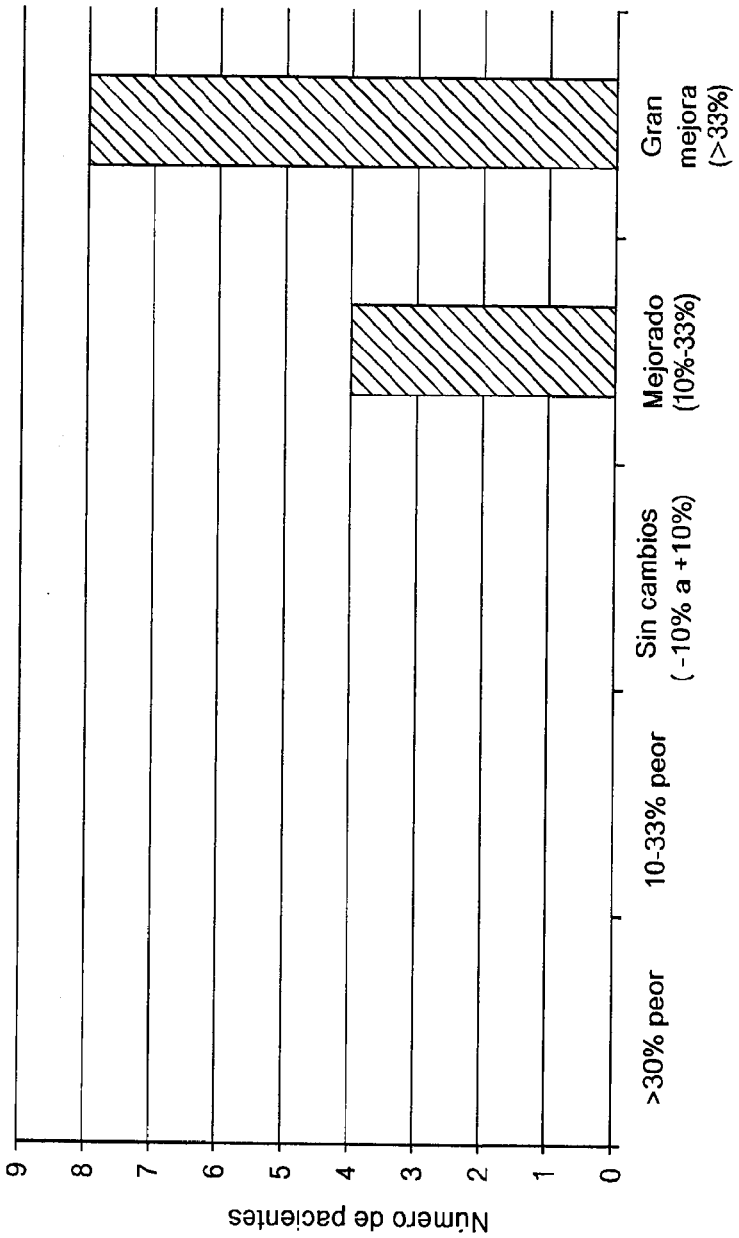

Número de pacientes
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
>30% peor
10-33% peor
Sin cambios
(-10% a +10%)
Mejorado
(10%-33%)
Gran
mejora
(>33%)

FIG. 5

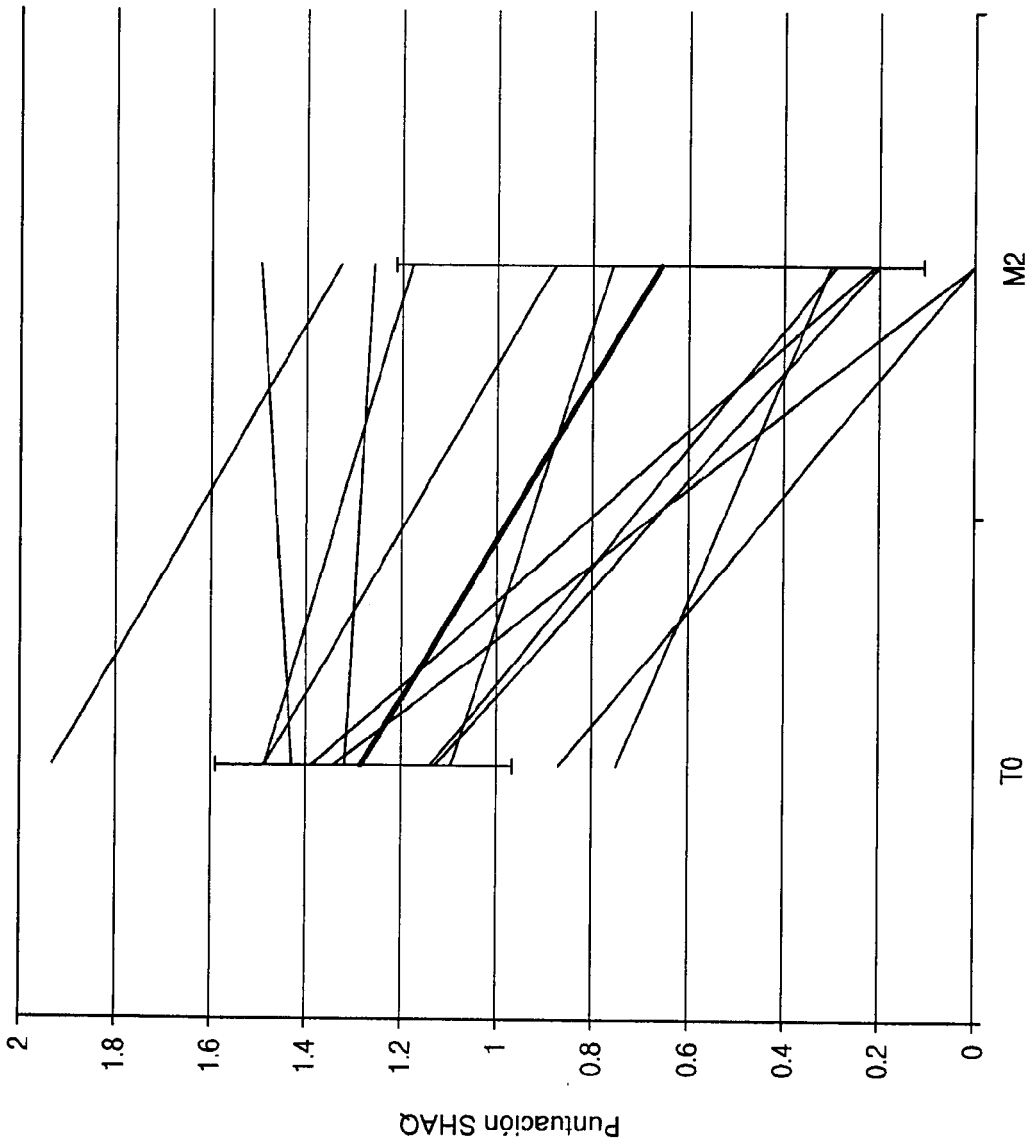


FIG. 6

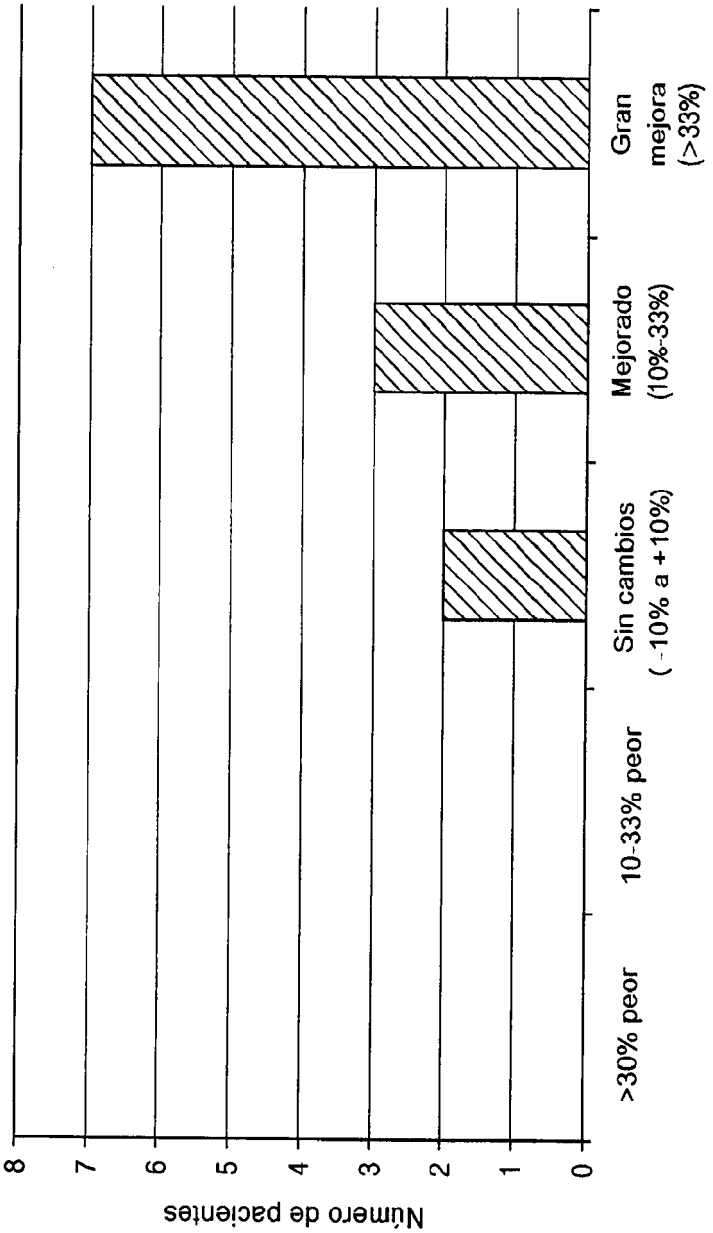

Número de pacientes
8
7
6
5
4
3
2
1
0
>30% peor
10-33% peor
Sin cambios
(-10% a +10%)
Mejorado
(10%-33%)
Gran
mejora
(>33%)

FIG. 7

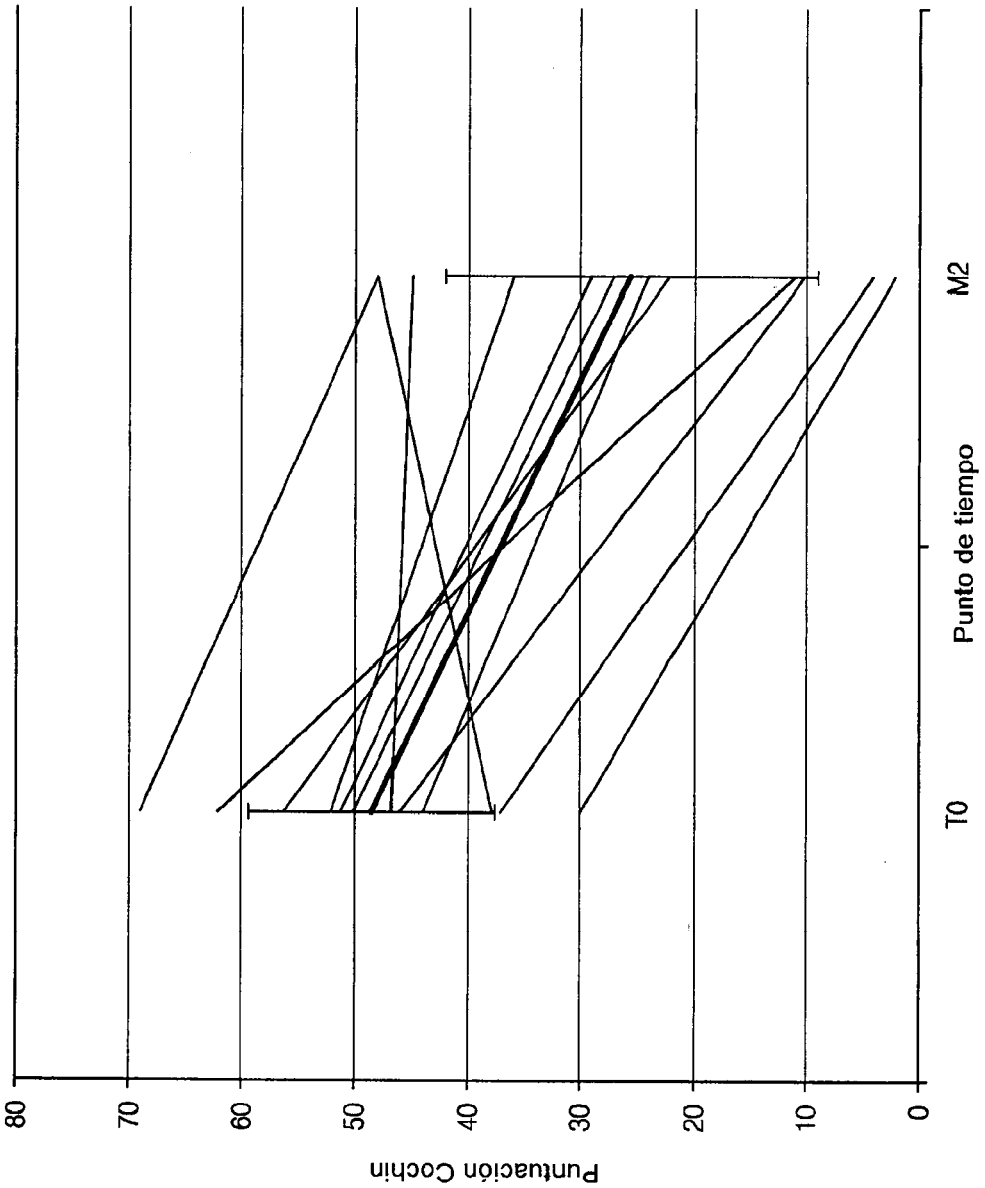

80
70
60
50
40
30
20
10
0
Puntuacion Cochin
T0
Punto de tiempo
M2

FIG. 8

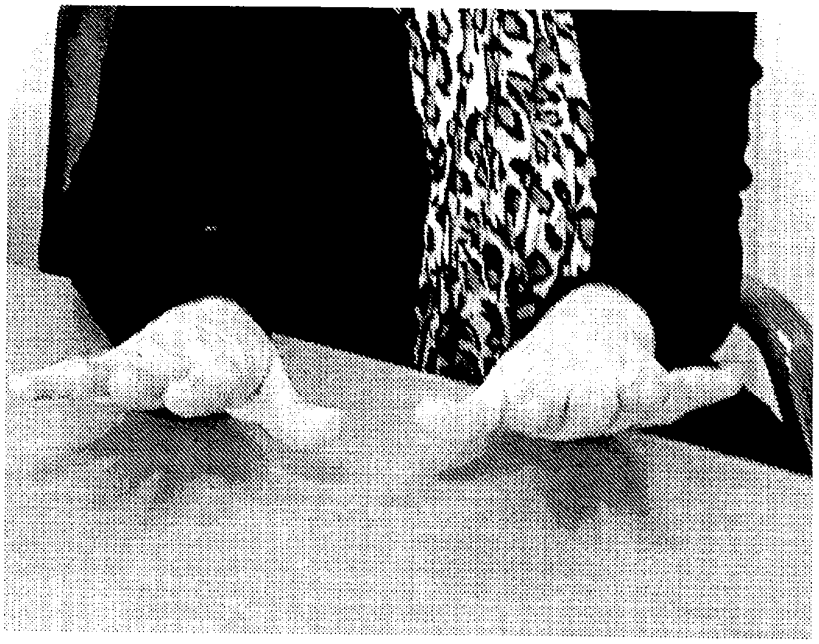


FIG. 9

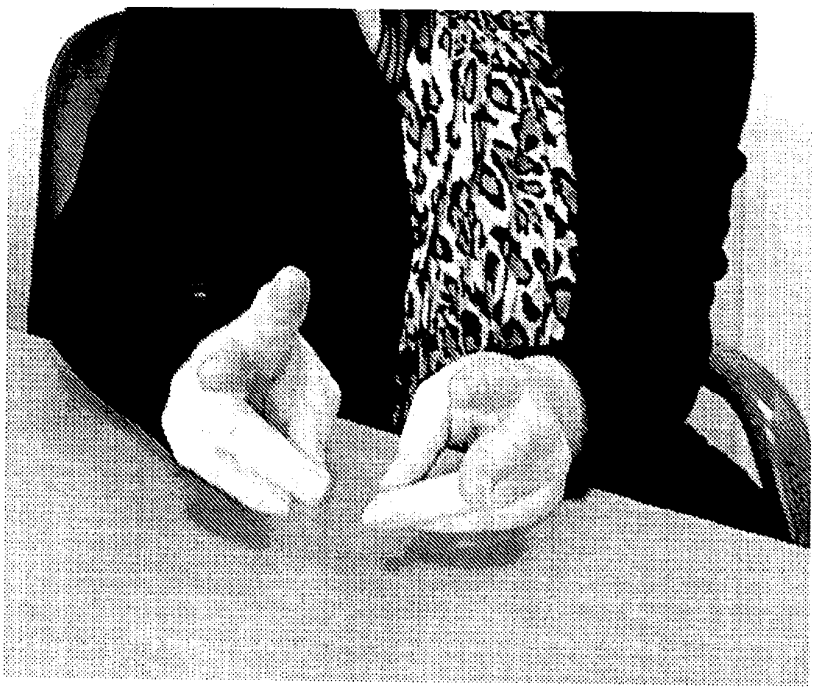
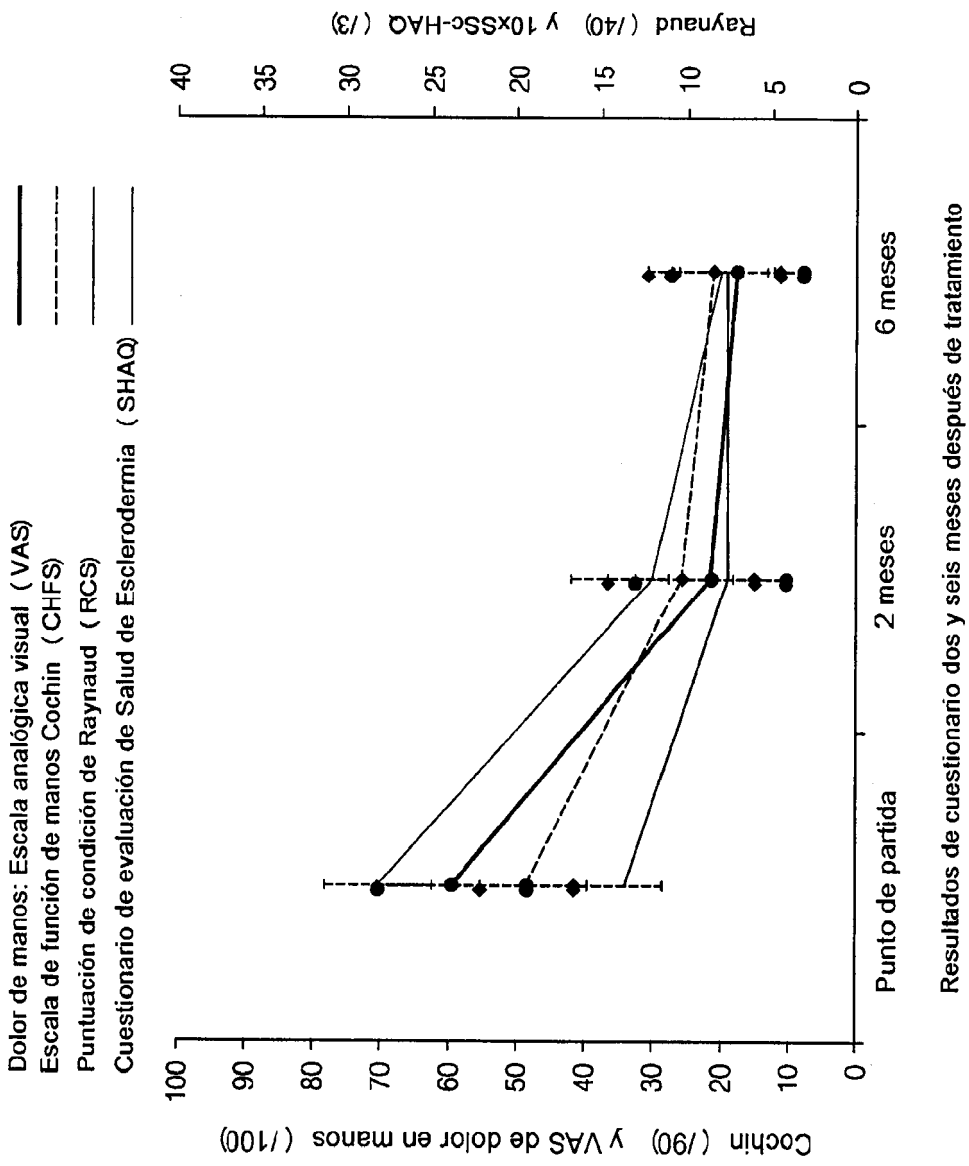


FIG. 10



Resultados de cuestionario dos y seis meses después de tratamiento

FIG. 11