

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 394**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2006.01)

A01N 65/00 (2009.01)

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2006 E 12159277 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 2471368**

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

30 Prioridad:

31.03.2005 US 666582 P
29.03.2006 US 391709

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.03.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

ES 2 657 394 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

Luz como reemplazo de factores mitogénicos en células progenitoras

Campo

5 La presente invención se refiere en general a diferenciación celular y tratamiento médico. Específicamente, la presente invención se refiere a métodos para estimular la proliferación, migración, diferenciación y supervivencia de células usando un parámetro específico de luces. Estos métodos son particularmente útiles en la regeneración celular y el reemplazo en la lesión tisular y en el trasplante de órganos, tejidos y células.

Antecedentes

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

15 Las células madre son células no diferenciadas capaces de (a) proliferación, (b) automantenimiento, (c) la producción de un gran número de progenie funcional diferenciada, (d) regeneración de tejido después de la lesión y/o (e) flexibilidad en el uso de estas opciones. Las células madre son objetivos importantes e ideales para la terapia génica, donde los genes insertados promueven la salud de las personas a las que se les trasplantan las células madre. Además, las células madre pueden desempeñar un papel importante en el trasplante de órganos o tejidos, por ejemplo, la regeneración del hígado y el injerto de piel.

20 Por ejemplo, las células madre neurales (NSC) son células no diferenciadas que tienen la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse en fenotipos neuronales y gliales. Una preocupación principal en la investigación con células madre es determinar las condiciones óptimas para la expansión de NCS en cifras clínicamente relevantes mientras se mantiene un cariotipo normal y capacidades de diferenciación consistentes. El concepto de diferenciación celular de células madre se muestra en la Figura 1 (Shihabuddin et al., Mol Med Today Vol. 5, (1999)). Actualmente, el único método para lograr la expansión de NCS es mediante modificación genética para establecer una línea celular inmortalizada o estimulando las células con factores mitogénicos exógenos tales como el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF). No obstante, el coste de usar un factor mitogénico como agente terapéutico es elevado.

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

40 Setoguchi et al. (Experimental Neurology, 189: 33-44 (2004)) divulga que las células precursoras neuronales, que están genéticamente modificadas para inhibir la señalización de la proteína morfogenética ósea por expresión de nogina, se diferencian en neuronas, oligodendrocitos y astrocitos después del trasplante.

Lindvall et al. (Trends in Neuroscience 14: 376-84 (1991)) divulga el trasplante de células al cerebro y la médula espinal como una estrategia terapéutica en trastornos neurodegenerativos.

45 Gasparyan et al. examinaron la influencia de la luz láser sobre la migración de células madre (línea de células madre FDCP-mix) en ausencia y en presencia de SDF-1 (Proceedings of Spie 5968: 596808-596808-6 (2005)). Este estudio demostró que la radiación láser puede estimular la motilidad de las células madre in vitro, y especialmente aumentar la migración hacia un mayor gradiente de SDF-1.

50 Wollman et al. (Neurological Research 18: 467-70 (1996)) divulga el uso de células cerebrales fetales cultivadas en cultivo tisular para estudiar algunas características básicas de la interacción entre la irradiación láser de baja potencia y los sistemas biológicos. Los resultados revelaron brotes masivos de neuritas y el crecimiento de células cerebrales en cultivo.

La LT, sin embargo, no se ha usado como un reemplazo de factores mitogénicos para soportar la supervivencia, proliferación, diferenciación y migración celular.

Resumen

- En un aspecto, la presente invención se refiere a una célula madre aislada no diferenciada o una célula progenitora aislada no diferenciada para uso en un método para tratar una enfermedad o afección en un sujeto, donde dicha utilización comprende exponer dicha célula madre aislada no diferenciada o célula progenitora aislada no diferenciada in vitro a una estimulación con luz que promueve la diferenciación o proliferación celular y trasplante de dicha célula estimulada por luz en dicho sujeto que necesita una célula diferenciada de dicha célula madre aislada no diferenciada o célula progenitora aislada no diferenciada, donde dicha estimulación con luz se realiza con una luz que tiene longitud de onda de 200-1500 nm, una densidad de potencia de 0.001-500 mW/cm², y una dosis de luz total de 0.001-100 J.
- Una divulgación del presente documento se refiere a métodos para usar el tratamiento con luz como un reemplazo de factores mitogénicos en la estimulación de la diferenciación, proliferación y migración celular. Estos métodos son útiles en una variedad de aplicaciones clínicas. En una realización, estos métodos son útiles en la regeneración celular y la sustitución en lesiones tisulares, tales como lesión del sistema nervioso central (SNC), lesión del sistema nervioso periférico (SNP), enfermedades neurodegenerativas y en el trasplante de órganos, tejidos y células.
- En una realización, la proliferación y diferenciación de células aisladas y progenitoras no diferenciadas se logra usando parámetros específicos de luz que puedan incluir la longitud de onda, la densidad de potencia y la dosificación.
- En otra realización, el uso contiene la etapa de exponer células madre aisladas no diferenciadas o células progenitoras aisladas no diferenciadas a una estimulación con luz. La estimulación con luz se realiza usando una fuente de luz que tiene una longitud de onda en la región ultravioleta, región visible o región infrarroja, a una densidad de potencia de 0.001-500 mW/cm², y una dosis de luz total de 0.001-100 J. La estimulación con luz se realiza en un entorno in vitro.
- En una realización preferida, la estimulación con luz se realiza usando una fuente de luz que tiene una longitud de onda dentro del intervalo de 200-1500 nm, una densidad de potencia de 0,5-150 mW/cm² y una dosificación de luz total de 0,1-50 J.
- En una realización más preferida, la estimulación con luz se realiza usando una fuente de luz que tiene una longitud de onda de aproximadamente 810 nm, una densidad de potencia de aproximadamente 1 mW/cm², 50 mW/cm² o 100 mW/cm² y una dosificación de luz total de aproximadamente 0.2-10J.
- También se divulga un método para tratar una enfermedad en un mamífero o no mamífero usando células, tejidos u órganos estimulados por luz.
- En una divulgación, las células, tejidos u órganos se estimulan con luz in vitro en las condiciones descritas anteriormente. Las células, tejidos u órganos tratados se trasplantan luego al mamífero o no mamífero enfermo.
- En otra divulgación, las células, tejidos u órganos se estimulan con luz in vivo en el mamífero o no mamífero enfermo.
- Otra divulgación del presente documento se refiere a células, tejidos y órganos tratados con luz. Las células, los tejidos y los órganos tratados con luz se pueden usar tanto para investigación como para aplicaciones clínicas. Una mejor comprensión de la presente invención, sus diversos aspectos y sus ventajas serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la siguiente descripción detallada, tomada junto con los dibujos adjuntos, en donde se muestra y describe la realización preferida de la invención, simplemente a modo de ilustración del mejor modo contemplado para llevar a cabo la invención.
- Breve descripción de las figuras
- La Figura 1 es un esquema de la diferenciación celular de células madre.
- La Figura 2 ilustra el diseño experimental general para la optimización de los parámetros del tratamiento con luz.
- Las Figuras 3A-3E ilustran el efecto de la estimulación con luz de diferentes longitudes de onda sobre el crecimiento del área superficial de NHNPC. Las Figuras 3A-3D son imágenes de NHNPC en diversas condiciones de tratamiento que se muestran en las figuras. La Figura 3E es un gráfico que resume el efecto de varias longitudes de onda de NHNPC. Se utilizó un análisis del área de superficie para evaluar el crecimiento de las NHNPC. Se seleccionaron veinte regiones aleatorias por portaobjetos por grupo con una potencia óptica baja (objetivo 10x) después de la fijación para cuantificar. Los datos se presentan como media ± SEM.
- La Figura 4 muestra el efecto de la estimulación con luz de diferentes densidades de potencia sobre el crecimiento de la superficie de NHNPC. Las NHNPC se expusieron a una luz de 810 nm a densidades de potencia que variaban de 1 mW a 100 mW una vez al día durante tres días consecutivos.
- Las Figuras 5A-5G muestran el efecto de la estimulación con luz de diferentes dosis de luz total sobre el crecimiento del área superficial de NHNPC. Los portaobjetos tratados con luz se expusieron a luz de 810 nm a dosis que varían de 0,005 J/cm² a 6 J/cm² una vez al día durante tres días consecutivos.
- Las Figuras 5A-5F son imágenes de NHNPC en diversas condiciones de tratamiento. La Figura 5G es un gráfico que resume el efecto de diversas dosificaciones sobre el crecimiento de NHNPC.

La Figura 6 son NHNPC cultivadas en placas y crecidas en condiciones normales (A-C) (en presencia de factores de crecimiento: FGF-2 y EGF), o tratadas con luz de 810 nm y en ausencia de factores (D) durante 7 días. Se fijaron y procesaron para inmunocitoquímica de etiqueta única usando musashi (A) y nestina (B), o inmunocitoquímica de doble etiqueta usando TUJ1 y GFAP y se contratiñeron con DAPI (azul) para visualizar los núcleos. Las NHNPC tratados con factor (C) y las NHNPC tratados con luz de 810 nm (D) se marcaron con TUJ1 (rojo) y GFAP (verde). Barra = 100 μm (A, B); 200 μm (C, D).

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

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

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

La Figura 10 es un gráfico que muestra la migración de NHNPC ingenuas, definidas como NHNPC que no estuvieron expuestas a factores de crecimiento, suero o tratamiento con luz. Estas células fueron privadas de alimento durante 18-24 horas antes del ensayo. Luego se colocaron en uno de los cuatro tipos de medio atrayente durante 24 horas: 1) Medio de inanición: no contiene factores de crecimiento; 2) Medios de Factor de Crecimiento: contiene EGF y FGF-2; 3) Medios celulares con luz condicionada: medios tomados de células expuestas a luz de 810 nm, 50 mW/cm² durante tres días consecutivos; o 4) Medios de inanición tratados con luz: medios de inanición tratados con luz de 810 nm, 50 mW/cm² durante tres días consecutivos. Datos representados como la media \pm SEM de las densidades ópticas menos la densidad óptica del control en blanco dividida por la media de los datos del medio de inanición, expresada como % de control.

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

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

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

La Figura 14 es la representación general del proceso de cultivo de NHNP.

55 Descripción detallada

La práctica de las realizaciones descritas en más detalle a continuación empleará, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de microbiología, biología molecular e inmunología dentro de la experiencia en la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la literatura.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una célula madre aislada no diferenciada o a una célula progenitora aislada no diferenciada para uso en un método para tratar una enfermedad o afección en un sujeto, donde dicha utilización comprende exponer dicha célula madre aislada no diferenciada o no diferenciada célula progenitora aislada in vitro a una estimulación con luz que promueve la diferenciación o proliferación celular y trasplante de dicha célula estimulada por luz a dicho sujeto que necesita una célula diferenciada de dicha célula madre aislada no diferenciada o célula progenitora aislada no diferenciada, donde dicha estimulación con luz se realiza con un luz que tiene una longitud de onda de 200-1500 nm, una densidad de potencia de 0.001-500 mW/cm², y una dosis de luz total de 0.001-100 J.

Una divulgación del presente documento se refiere a métodos para usar el tratamiento con luz como un reemplazo de factores mitogénicos en la estimulación de la diferenciación, proliferación y migración celular.

El tratamiento con luz ayuda a la supervivencia, crecimiento de neuritas y migración de células de no mamíferos y de mamíferos, tales como células madre/progenitoras. La estimulación con luz a longitudes de onda específicas también hace que las células madre/progenitoras neuronales se diferencien en diferentes fenotipos neuronales. El tratamiento con luz, por lo tanto, se puede usar como un reemplazo de los factores de crecimiento para 1) apoyar la proliferación celular y la capacidad de supervivencia en el cultivo de tejidos; 2) causar la diferenciación de células madre/progenitoras en diferentes tipos de células (por ejemplo, las células estromales de médula ósea (BMSC) pueden generar hueso, cartílago, grasa, tendón, músculo y células neuronales); y 3) causar la diferenciación de células madre/progenitoras en fenotipos celulares específicos (por ejemplo, progenitores neuronales que generan fenotipos neuronales específicos tales como neuronas glutamatérgicas, neuronas dopaminérgicas, etc.). La presente invención también se puede usar in vitro para una variedad de aplicaciones médicas. Por ejemplo, tratar lesiones de tejidos. Se puede emplear en el entorno clínico en combinación con técnicas de trasplante para apoyar el reemplazo de tipos celulares específicos en el cuerpo humano.

Por consiguiente, una divulgación del presente documento se refiere a un método para estimular la proliferación, diferenciación y migración de células y progenitores utilizando un parámetro específico de luz que puede incluir la longitud de onda, la densidad de potencia y la dosificación. Las células tratadas con luz se pueden utilizar en una variedad de aplicaciones clínicas y de investigación.

En una realización, el uso comprende la etapa de exponer células madre aisladas no diferenciadas o células progenitoras aisladas no diferenciadas a una estimulación con luz. Las células madre aisladas no diferenciadas o células progenitoras aisladas no diferenciadas pueden aislarse de células madre o progenitoras, tales como células progenitoras neurales, células estromales de la médula ósea, células madre mesenquimales, células madre mesenquimales de la médula ósea, células madre mesenquimales placentarias, células madre mesenquimales derivadas de sangre periférica, células madre olfativas derivadas, células madre grasas derivadas, células madre y precursoras endoteliales, células madre dérmicas del folículo piloso, células madre y progenitoras cardíacas residentes, células madre/progenitoras de hígado fetal y células madre embrionarias no humanas. La estimulación con luz se realiza en un entorno in vitro.

En el entorno in vitro, las células aisladas no diferenciadas se cultivan en condiciones adecuadas de cultivo tisular, que típicamente requieren un medio de cultivo especialmente diseñado, un entorno humidificado rico en CO₂ y una temperatura de incubación de aproximadamente 37 ° C. Diferentes células progenitoras/madre requieren mitógenos o factores de crecimiento, aunque las condiciones de cultivo pueden variar. Condiciones de cultivo específicas para diversas células madre/progenitoras se pueden encontrar en Fred Gage et al., Science 287: 1433-1438 (2000) y www.Worldhealth.net/p/1053,2161, que se incorporan aquí como referencia en su totalidad. Las células cultivadas se siembran en placa o suspenden a la densidad adecuada y se someten a estimulación con luz.

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

En una realización preferida, la estimulación con luz se realiza usando una fuente de luz que tiene una longitud de onda dentro del intervalo de 200-1500 nm, una densidad de potencia de 0,5-150 mW/cm² y una dosificación de luz total de 0,1-50 J.

En una realización más preferida, la estimulación con luz se realiza usando una fuente de luz que tiene una longitud de onda de aproximadamente 810 nm, una densidad de potencia de aproximadamente 1 mW/cm², 50 mW/cm² o 100 mW/cm² y una dosificación de luz total de aproximadamente 0.2-10J.

Las células estimuladas con luz se incuban en condiciones que permiten la diferenciación y proliferación celular. Las células diferenciadas se pueden cosechar, suspender a una concentración adecuada y trasplantarse a un sujeto que se beneficiará de un trasplante de células. Los métodos y condiciones del trasplante celular han sido bien establecidos en la literatura. En una realización, las células tratadas con luz son células progenitoras neuronales humanas, y el sujeto es un sujeto con lesión del sistema nervioso central (SNC) o lesión del sistema nervioso periférico (SNP), tal como lesión de la médula espinal, accidente cerebrovascular y lesión cerebral traumática. En otra realización, el sujeto es un sujeto que tiene una enfermedad neurodegenerativa y otras enfermedades o afecciones. La enfermedad

neurodegenerativa incluye, pero no se limita a, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la esclerosis múltiple y la ELA. Otras enfermedades o afecciones que pueden beneficiarse del trasplante de células estimuladas por la luz incluyen, entre otras, trasplante de hígado, diabetes y enfermedades cardíacas, tales como infarto agudo de miocardio.

- 5 En otra descripción, las células madre y/o progenitoras también pueden exponerse a la estimulación con luz en un entorno in vivo. Se puede introducir una fuente de luz en el sitio de tratamiento a través de un catéter o un procedimiento quirúrgico. La longitud de onda, la densidad de potencia y la dosificación de luz total pueden optimizarse de acuerdo con la ubicación y el tipo de células que necesitan estimulación.

- 10 Otra descripción del presente documento se refiere a un método para tratar una enfermedad o afección en un mamífero o no mamífero usando tejidos u órganos estimulados por luz. En una descripción, las enfermedades y afecciones tratables con la presente invención incluyen, pero sin limitación, lesión del SNC y lesión del sistema SNP, tales como lesión de la médula espinal, apoplejía y lesión cerebral traumática; enfermedades neurodegenerativas, tales como enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple o ALS; diabetes y enfermedades del corazón, como infarto agudo de miocardio.

- 15 En una descripción, los tejidos u órganos se estimulan con luz in vitro en las condiciones descritas anteriormente. Los tejidos u órganos tratados con luz se trasplantan luego al mamífero o no mamífero enfermo.

En otra descripción, los tejidos u órganos se estimulan con luz in vivo en el mamífero o no mamífero enfermo.

Otra descripción del presente documento se refiere a células, tejidos y órganos tratados con luz. Las células, tejidos y órganos tratados con luz pueden usarse para aplicaciones clínicas.

- 20 Una ventaja de la presente invención incluye, pero no se limita a:

Preparación de la célula: la luz eliminará/reemplazará la necesidad de factores de crecimiento costosos.

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

Las longitudes de onda de luz específicas pueden hacer que las células pluripotentes sean "forzadas" a tipos específicos de células, que de nuevo serían importantes para los campos de regeneración y reemplazo celular en una lesión tisular, tales como lesiones y enfermedades del SNC o SNP y para los campos de trasplante de órganos, tejidos y células.

- 30 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitativos.

Ejemplo 1. Material y método

(a) Preparación de cultivo de células NHNP

- 35 El proceso de cultivo de NHNP se muestra en la Figura 2. En general, las células progenitoras neuronales humanas normales (NHNPC) recibieron medios con factores (FM) que contenían EGF (hr) recombinante humano, hrFGF-2 y factor de supervivencia neural-1, o medios sin factores (M). Ambos tipos de medios contienen antibióticos. Las células se sembraron en placa a una densidad de siembra de ~ 25,000 células/cm² en portaobjetos de 2 cámaras recubiertas con polietilenoimina (PEI) o laminina.

- 40 En resumen, las células NHNP se descongelaron en un baño de agua a 37 °C durante 1-2 minutos, se resuspendieron en medio de mantenimiento de progenitor neural tibio (37 °C) (NPMM) y se incubaron (24 horas, 37 °C, 5 % de CO₂). El NPMM contenía sulfato de gentamicina, EGF recombinante humano (hr), hrFGF-2 y factor de supervivencia neural-1 (NSF-1). Las células se transfirieron a tubos de plástico de 50 ml y se centrifugaron (1000 rpm, 5 min). Se retiró el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en medio basal progenitor neuronal (NPBM) (para control y portaobjetos tratados con luz) o NPMM (para portaobjetos). El NPBM contenía todos los mismos ingredientes que el NPMM excepto los factores de crecimiento y NSF-1. Las células se sembraron en placa en portaobjetos de polietilenoimina (PEI) o en cámara revestida con laminina a una densidad de siembra de ~ 25,000 células/cm². Todos los productos fueron comprados de Cambrex (Walkersville, MD).

(b) Evaluación de parámetros óptimos: longitud de onda, densidad de potencia y dosificación

- 50 Las NHNPC se sembraron en placa en portaobjetos y se trataron con luz una vez al día durante tres días y se cultivaron durante un total de siete días en tres experimentos separados usando las siguientes condiciones: 1) Longitudes de onda: 458,6, 477, 488,7, 515, 646, 660, , 780, 807, 810 y 975 nm; 2) Dosificación (luz de 810 nm): 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 4 y 6 J/cm²; y 3) densidad de potencia (810 nm de luz, 0,2 J/cm²): 1, 3, 10, 30, 50 y 100 mW/cm². Para cada uno de los tres experimentos, el diámetro del tamaño del punto de láser (s) fue de 10 mm, el área

fue de 0.785398 cm², y se utilizó un mínimo de dos portaobjetos que contenían NHNPC por grupo experimental. Además, cada experimento tenía dos portaobjetos, Control (sin luz, sin factores de crecimiento) y Factores (solo factores de crecimiento, sin luz). Se utilizó un análisis de área superficial para evaluar el crecimiento de las NHNPC después de la conclusión de cada experimento. Se eligieron veinte regiones aleatorias por portaobjeto por grupo con una potencia óptica baja (10xobjetivos) usando un microscopio Nikon (Tokio, Japón), después de la fijación para cuantificar. Los datos se presentan como media ± SEM.

(c) Tratamiento de luz

Las NHNPC se separaron en cuatro grupos: control (sin luz, sin factores de crecimiento), factores (solo factores de crecimiento, sin luz), 50 mW/cm² (solo luz, sin factores de crecimiento) y 100 mW/cm² (solo luz, no hay factores de crecimiento). Todas las NHNPC tratadas con luz se expusieron a un láser de diodos de 150 mW a 810 nm a una dosis de 0,2 J/cm² cada día durante 3 días a una densidad de potencia de 50 mW/cm² durante 4 segundos o 100 mW/cm² durante 2 segundos.

(d) Ensayo de actividad de proliferación celular

La proliferación celular de las NHNPC se determinó usando el ensayo CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (Promega, Madison, WI) y el kit de ensayo de proliferación celular Cyquant (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) de acuerdo con los fabricantes. Las células usadas en los ensayos de proliferación de Promega y Cyquant se cultivaron en concordancia: las células en el grupo de medios estándar se cultivaron en medio estándar (NPBM más sulfato de gentamicina). Las células en el medio estándar + suero se cultivaron en medio estándar más NSF-1 (suero). Las células en el medio estándar + factor + suero se cultivaron en medio estándar más hrEGF (20 ng/ml), hrFGF-2 (20 ng/ml) y factor de supervivencia neural-1. Las células en el medio estándar + grupo con luz se cultivaron en medio estándar y se trataron con luz (810 nm, 0,2 J/cm², 50 mW/cm²) durante tres días consecutivos. Las células para los ensayos de Promega y Cyquant se sembraron en placas sin revestir de 24 pocillos a una densidad de siembra de ~25,000 células/cm².

(e) Ensayo de migración

El ensayo de migración de células colorimétricas de 24 pocillos QCM (Chemicon, Temecula, CA) se usó de acuerdo con el fabricante. NHNPC ingenuas, definidas como células NHNP que no estuvieron expuestas a factores de crecimiento, suero o tratamiento con luz. Estas células se privaron de alimento en medios libres de suero y factores durante 18-24 horas antes del ensayo. La suspensión celular se retiró y se colocó dentro de un inserto que luego se colocó en un pocillo de una placa de 24 pocillos que contenía uno de los cuatro tipos de medio atrayente: 1) Medio de inanición: no contiene factores de crecimiento o suero; 2) Medios de Factor de Crecimiento: contiene EGF y FGF-2; 3) Medios celulares con luz moderada: medios tomados de células expuestas a 810 nm, 50 mW/cm² de luz, 0,2 J/cm² durante tres días consecutivos; o 4) Medio de inanición tratado con luz: medio de inanición tratado con luz de 810 nm, 50 mW/cm², 0,2J/cm² durante tres días consecutivos. Las placas se incubaron luego durante 24 horas a 37 °C en una incubadora de CO₂ (4-6% de CO₂). Las células/medios del lado superior del inserto se eliminaron pipeteando la suspensión celular restante. El inserto de migración se colocó luego en un pocillo limpio que contenía Cell Stain y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. El inserto se eliminó de la tinción celular y se sumergió en agua estéril varias veces para enjuagar y se usó un hisopo con punta de algodón para retirar suavemente las células no migratorias del interior del inserto y se dejó secar. El inserto teñido se transfirió a un pocillo que contenía regulador de extracción y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos y luego se eliminó. La mezcla de tinte se transfirió a una placa de microtitulación de 96 y la densidad óptica se midió a 560 nm.

(f) Estadísticas

El programa de software estadístico GraphPad Prism versión 3.02 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, www.graphpad.com) se usó para el análisis de datos. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba posterior de Tukey para la comparación de grupos individuales. Los datos se presentan como media ± SEM.

(g) Inmunotinción

Las NHNPC cultivadas se fijaron en paraformaldehído al 4% (Sigma) en solución salina regulada con fosfato (PBS) durante 10 minutos a temperatura ambiente cuatro días después del último día de tratamiento con luz. Las células se enjuagaron y se almacenaron en PBS. Para la inmunotinción, las células se trataron con anticuerpo primario durante 1 hora a 4 °C para la doblecortina, o durante la noche a 4 °C para todos los demás anticuerpos. Los anticuerpos primarios empleados y sus diluciones fueron los siguientes: nestina monoclonal (1:100, Chemicon, Temecula, CA); Musashi policlonal (1: 200, Chemicon, Temecula, CA); proteína glial fibrilar ácida (GFAP) policlonal (1:300, DAKO, Carpintería, CA), anti β-tubulina isotipo III (TUJ1) monoclonal (1:75, Sigma, St. Louis, MO); FGF-2 policlonal (1: 100, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) y Doublecortin (DCX) policlonal (1: 3000, Chemicon, Temecula, CA). Para la detección de anticuerpos primarios, se usaron anticuerpos secundarios marcados con fluoresceína (FITC) o CY3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Los portaobjetos se montaron en Vectashield con un medio de montaje DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA) para fluorescencia y se colocó el cubreobjetos. No se añadió anticuerpo primario para portaobjetos de control negativo.

Los portaobjetos se fotografiaron con un microscopio fluorescente Labophot de Nikon (Tokio, Japón) y las imágenes se capturaron con una cámara digital estabilizable DKC 5000 Catseye de Sony (Tokio, Japón).

(h) RT-PCR

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

(i) Cuantificación del crecimiento de neurita

20 Los efectos de diferentes aplicaciones de tratamiento sobre el crecimiento de neuritas en los cuatro grupos se analizaron después de la inmunocitoquímica con doblecortina (DCX). DCX es una fosfoproteína que se expresa ampliamente en el SNC y está presente en las neuronas jóvenes que migran y diferencian. Las diapositivas se analizaron usando Neuron J en la Imagen J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Para cada diapositiva, se seleccionaron un mínimo de cinco neuroesferas al azar y se obtuvieron imágenes con un microscopio fluorescente Nikon Labophot, y las imágenes se capturaron con una cámara digital Sony DKC 5000 Catseye. Todos los procesos fueron medidos. Los datos se presentan como media ± SEM.

Ejemplo 2. Optimización de parámetros de tratamiento con luz en células NHNP

30 Se obtienen células progenitoras neurales humanas (NHNP) normales crioconservadas de Cambrex (Walkersville, MD). Los parámetros óptimos del tratamiento con luz se identificaron a través de una serie de experimentos utilizando las células NHNP. Estos parámetros incluyen la determinación de la 1) longitud de onda óptima, 2) densidad de potencia, y 3) dosificación. Todos los portaobjetos en todos los experimentos contenían las células NHNP y se trataron con parámetros de luz específicos una vez al día durante tres días consecutivos. Al finalizar el régimen de tratamiento, las células se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 10 minutos y se mantuvieron en PBS para su posterior procesamiento y análisis. Los portaobjetos de control no recibieron tratamiento con luz y no contenían ningún factor de crecimiento o suero. Los portaobjetos con Factor no se expusieron al tratamiento con luz, pero sí contenían factores de crecimiento (factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2) y factor de crecimiento epidérmico (EGF)) y suero. FGF-2 y EGF estimulan las células y causan la proliferación celular, pero ninguno es necesario para la diferenciación. El resto de los portaobjetos eran portaobjetos tratados con luz y no contenían factores de crecimiento.

40 El ensayo utilizado para evaluar las células de NHNP en cada condición de tratamiento fue un recuento de área superficial. Usando una retícula, se evaluaron los portaobjetos al finalizar el regimiento de tratamiento, a 10 aumentos en nuestro microscopio Nikon. El tamaño de la caja reticular con un aumento de 10X es de 1 mm². Veinte medidas se obtuvieron de cada diapositiva. Se midió el área superficial (mm²) cubierta por las células NHNP en la caja reticular y se realizó un análisis estadístico usando un ANOVA de una vía y prueba Tukey Post hoc.

Parámetros óptimos

45 Los efectos de diversas longitudes de onda, densidades de potencia y dosificaciones en NHNPC se evaluaron mediante cobertura del área superficial. En las figuras. 3A-3E, se probaron diez longitudes de onda de luz para determinar la cantidad de crecimiento de área superficial soportada. Aunque el análisis estadístico usando ANOVA de una vía con una prueba post hoc de Tukey comparó todos los grupos, se indican diferencias significativas para los grupos Factores y 810 nm en comparación con el grupo de Control. Las células sujetas a Factores o luz de 810 nm cubrieron significativamente más área superficial que el grupo Control (* p <0.001). Las células sometidas a 515 nm de luz cubrieron significativamente menos área superficial en comparación con el grupo con Factores (p <0,001) y el grupo de control (p <0,0002). Se determinó que las NHNPC tratados con luz de 810 nm eran la longitud de onda óptima. En la Figura 4, las células se trataron con luz de 810 nm a densidades de potencia de 1, 3, 10, 30, 50 y 100 mW/cm². El resultado muestra que 1 (* p <0.01), 50 (** p <0.007), 100 mW/cm² (p <0.01) y las células tratadas con Factores (** p <0.001) cubrieron significativamente más área de superficie que el Control grupo. En consecuencia, la densidad de potencia óptima para las NHNPC se determinó a 1, 50 y 100 mW/cm², ya que el tratamiento con luz a estas densidades de potencia condujo a un crecimiento celular comparable al crecimiento de las células tratadas con Factores. Como se muestra en las Figuras 5A-5G, no hubo significado estadístico entre grupos del Factor (B, G) y 0,2

J/cm² (E, G). Tanto el Factor como las NHNPC tratadas con 0,2 J/cm² tenían significativamente más área superficial cubierta en comparación con el grupo Control (A, G) (* p <0,001). En base a estos experimentos, se determinó que las NHNPC responden mejor a 810 nm de luz a una dosis de 0,2 J/cm², y a densidades de potencia de 1, 50 o 100 mw/cm².

5 Ejemplo 3: El tratamiento con luz promueve el crecimiento neuronal

Para caracterizar las NHNPC, se examinaron la expresión de nestina (verde, figura 6A), musashi (verde, figura 6B), TUJ1 (rojo) y GFAP (verde) (figura 6C, D). Las células se cultivaron de acuerdo con el fabricante en presencia de factores de crecimiento y posteriormente se inmunomarcaron para los marcadores progenitores nestina y musashi. Las NHNPC etiquetadas con ambos marcadores progenitores (Figuras 6A y B), que demuestran la presencia de

10 células madre/progenitoras dentro de la neuroesfera.

Para determinar si la luz guiaría las NHNPC a fenotipos celulares específicos que difirieran de los de las NHNPC cultivadas en presencia de mitógenos, se realizó inmunocitoquímica para marcadores neuronales y gliales. Las NHNPC, cultivadas en presencia de factores de crecimiento, se marcaron para los marcadores neuronales y gliales (Figura 6C). Las NHNPC, expuestas a luz de 810 nm (50 mW/cm², 0,2 J/cm²) en ausencia de factores de crecimiento,

15 también se inmunomarcaron para TUJ1 y GFAP. En condiciones normales, los cultivos de NHNPC típicamente coexpresan GFAP y TUJ1 en cantidades equivalentes. Hubo una cantidad equivalente de la etiqueta neuronal y glial encontrada tanto en los factores como en el grupo de 50 mW/cm² (Figuras 6C y D), lo que indica que la luz no cambia la morfología fenotípica de las NHNPC bajo estos parámetros.

Las figuras 7A-7D son esquemas que muestran un diseño experimental para tratar células con luces de diferentes densidades de potencia. La Figura 7A es el grupo de control, cultivado en medio estándar (medio basal progenitor neuronal (NPBM) más sulfato de gentamicina). El grupo Control no recibió factores de crecimiento, suero o tratamiento con luz. Las NHNPC en el grupo Factor (B) se cultivaron en medio estándar más EGF recombinante humano (hr) (20 ng/ml), hrFGF-2 (20 ng/ml) y un suero patentado proporcionado por la compañía, Cambrex (Walkersville, MD) llamado factor de supervivencia neuronal-1 (NSF-1). Las células en los grupos con luz, de 50 mW/cm² (C) y 100 mW/cm² (D)

20 se cultivaron en medio estándar y se trataron con luz de 810 nm a una dosis de 0,2 J/cm² durante tres días consecutivos.

Ejemplo 4: Efecto de los tratamientos con luz en la proliferación, crecimiento de neuritas y migración

Se realizó el ensayo de proliferación de Promega para medir la actividad metabólica de las células viables basándose en la biorreducción de la sal de tetrazolio MTS en formazano, que es directamente proporcional al número de células vivas. Como se muestra en la FIG. 8A, se sembraron células de cada grupo. El grupo medios estándar + con luz se trató durante tres días consecutivos, se cultivó durante cuatro días adicionales y se trató una vez por semana hasta la conclusión del experimento. Las mediciones se analizaron por triplicado a 1, 2, 3 y 4 semanas. El análisis estadístico se realizó usando un ANOVA de una vía con una prueba post hoc de Tukey. En las semanas 1, 2, 3 y 4, el grupo

30 medios estándar + con luz aumentó significativamente la proliferación/actividad metabólica en comparación con los medios estándar + factores + suero, medios estándar y medios estándar + grupos séricos (p <0,001). El grupo de medios + factores + suero estándar tuvo una proliferación significativamente mayor que el grupo de medios estándar + suero (p <0,001) en los cuatro puntos de tiempo. Los datos se presentan como la media ± SEM. Los medios estándar + factores + suero y medios estándar + grupos séricos se disminuyeron durante las 4 semanas en comparación con los dos grupos restantes.

El ensayo de proliferación de Cyquant se realizó para determinar la proliferación celular en función del contenido de ADN de la muestra. Como se muestra en la Figura 8B, las medidas se analizaron por triplicado a 1, 2, 3 y 4 semanas. El análisis estadístico se realizó usando un ANOVA de una vía con una prueba post hoc de Tukey. En las semanas 1, 2 y 3, no hubo diferencia estadística en la proliferación entre ninguno de los cuatro grupos. En la semana 4, el grupo

40 medios + con luz estándar había aumentado significativamente la proliferación en comparación con el grupo de medios estándar (p <0,01). Los datos se presentan como la media ± SEM. El fabricante de las células confirma que estas células tienen una tasa de proliferación de muy baja a no significativa.

Para determinar si la luz influyó en el desarrollo de neuritas de las NHNPC, se realizó inmunocitoquímica para el marcador de migración neuronal, doblecortina (Figuras 9A-E). El crecimiento neurítico se evaluó y trazó para cada grupo (Figura 9F). El portaobjetos de control negativo (Fig. 9A) no contenía ninguna marca de DCX. Las NHNPC se colocaron en tres grupos: Control, Factores y tratados con luz. Los grupos Factores (D, F) y tratados con luz (E, F) tuvieron un crecimiento neurítico significativamente mayor (* p <0.001) en comparación con el grupo Control (C, F). Los grupos tratados con Factores y con luz no fueron significativamente diferentes entre sí. Barra = 200 μm. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la luz es capaz de inducir el crecimiento de neuronas de las NHNPC en ausencia de factores mitogénicos.

50

Para determinar el efecto de la luz sobre la migración de NHNPC, se expusieron NHNPC ingenuas a 1) medio de inanición; 2) medios de factores (factores de crecimiento y suero contenidos); 3) medio de inanición tratado con luz tomado a partir de 810 nm, 50 mW/cm², 0,2 J/cm² durante tres días consecutivos de cultivos tratados; o 4) medios de

55

inanición tratados con luz (medios de inanición tratados con luz de 810 nm, 50 mW/cm², 0,2 J/cm² durante tres días consecutivos en ausencia de células) durante 24 horas adicionales, y analizados.

5 Como se muestra en la Figura 10, las NHNPC expuestas a los medios con Factor (** p <0,05) y los medios de inanición condicionados con luz (* p <0,01) tuvieron un aumento significativo en la migración en comparación con los medios de inanición (ANOVA de una vía p = 0.002). La migración entre los medios con factores y los grupos de medios de inanición condicionados con luz fue comparable. Estos datos sugieren que factores indeterminados fueron secretados en el medio por células que fueron tratadas con la luz de 810 nm, y fueron capaces de soportar la migración.

Ejemplo 5: El tratamiento con luz induce la producción de mitógeno en células NHNP

10 La producción de FGF-2 se investigó para determinar si había una sobreexpresión o una desregulación del factor mitogénico después del tratamiento, usando inmunocitoquímica al finalizar el estudio.

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

20 Se realizó la RT-PCR inicial para determinar si los grupos expresaban ARNm para ciertos factores de crecimiento que incluían FGF-2, EGF, BDNF y NGF. Como se muestra en la FIG. 12, se colocaron NHNPC en cuatro grupos: Control, Factores, tratadas con luz (3 días) y tratadas con luz (7 días). Las células en el grupo Control se cultivaron en medio estándar (NPBM más sulfato de gentamicina). Las células del grupo con Factor se cultivaron en medio estándar más EGF recombinante humano (hr) (20 ng/ml), hrFGF-2 (20 ng/ml) y NSF-1. Las células en los grupos con luz se cultivaron en medio estándar y se trataron con luz (810 nm, 0,2 J/cm², 50 mW/cm²) durante tres días consecutivos. Todas las células se sembraron en placa en portaobjetos con cámara recubierta con laminina a una densidad de siembra de - 25,000 células/cm². Las células con Control, Factores y con luz (7 días) se recolectaron a los 7 días in vitro mientras que las células con luz (3 días) se recolectaron a los 3 días in vitro, después de lo cual se realizó RT-PCR. Los cebadores se diseñaron para FGF-2, EGF, BDNF, NGF y β-actina.

30 La Figura 12A es la expresión del gen de PCR para FGF-2, EGF, BDNF, NGF y β-actina. Las Figuras 12 B-E son la medición semicuantitativa para FGF-2, EGF, BDNF y NGF. La medición de las unidades de intensidad arbitraria de cada banda se determinó utilizando Multi Gauge (www.lifescience.fujifilm.com), y los valores se normalizaron en función de la muestra de β-actina. Este experimento se repitió dos veces. Los gráficos son promedios de ambas proporciones para cada factor de crecimiento. Los resultados muestran que todos los grupos expresaron ARNm de EGF (Figura 12C). Los dos grupos con luz y el grupo con Factores tuvieron una expresión de BDNF significativamente mayor que el grupo Control (p <0,05) (figura 12D). Como se muestra en Figura 12E, el grupo 7D con luz tenía una expresión de NGF significativamente mayor que los tres grupos restantes (p <0,001), mientras que el grupo 3D con luz tenía una expresión de NGF significativamente mayor que los grupos Control y Factores (p <0,001).

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

Tabla 1

Factor de crecimiento	Control	Factor	Con luz 3D	Con luz 7D
FGF2	-	+	++	++
FGF	++	+	+	+
BDNF	-	+	+	+
NGF	-	-	+	++

La expresión de proteínas de FGF-2, EGF, BDNF y NGF en NHNPC se muestra en la Figura 13. Las NHNPC se colocaron en tres grupos: Control, Factores y tratadas con luz. Los portaobjetos tratados con luz se trataron con luz

de 810 nm durante tres días. Las NHNPC de los grupos se fijaron y procesaron para inmunocitoquímica a los 7 días in vitro (barra de escala = 200 µm).

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> THE HENRY M. JACKSON FOUNDATION FOR THE ADVANCEMENT OF
 5 MILITARY MEDICINE, INC.
 SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES
 <120> LUZ COMO REEMPLAZO DE FACTORES MITOGÉNICOS EN CÉLULAS PROGENITORAS
 <130> P7307EPPC01
 <150> US 11/391,709
 10 <151> 2006-03-29
 <150> US 60/666,582
 <151> 2005-03-31
 <160> 10
 <170> PatentIn version 3.5
 15 <210> 1
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> ADN Cebador sintético artificial 1
 <400> 1
 gccacatcta atctcatttc aca 23
 <210> 2
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ADN Cebador sintético artificial 2
 <400> 2
 30 ctgggtaaca gcagatgcaa 20
 <210> 3
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> ADN Cebador sintético artificial 3
 <400> 3

ctaatcacct actcaatgcc tgg 23
 <210> 4
 <211> 25
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ADN Cebador sintético artificial 4
 <400> 4
 tgattctccc agtactctta cttgg 25
 10 <210> 5
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> ADN Cebador sintético artificial 5
 <400> 5
 agcctcctct tctcttctg ctgga 25
 <210> 6
 <211> 25
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ADN Cebador sintético artificial 6
 <400> 6
 25 cttttgtcta tgcccctgca gcctt 25
 <210> 7
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> ADN Cebador sintético artificial 7
 <400> 7
 ccaagggagc agctttctat cctgg 25
 <210> 8
 35 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ADN Cebador sintético artificial 8

<400> 8

ggcagtgca agggaatgct gaagt 25

5 <210> 9

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> ADN Cebador sintético artificial 9

<400> 9

gtggcatcca cgaaactacc tt 22

<210> 10

<211> 22

15 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ADN Cebador sintético artificial 10

<400> 10

20 ggactcgtca tactcctgct tg 22

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una célula madre aislada no diferenciada o una célula progenitora aislada no diferenciada para uso en un método para tratar una enfermedad o afección en un sujeto, en la que dicho método para tratar comprende exponer dicha célula madre aislada no diferenciada o célula progenitora aislada no diferenciada in vitro a una estimulación con luz que promueve la diferenciación o proliferación celular y trasplantar dicha célula estimulada con luz en dicho sujeto que necesita una célula diferenciada de dicha célula madre aislada no diferenciada o célula progenitora aislada no diferenciada, en la que dicha estimulación con luz se realiza con una luz que tiene una longitud de onda de 200-1500 nm, una densidad de potencia de 0.001-500 mW/cm², y una dosis de luz total de 0.001-100 J.
- 10 2. La célula madre aislada no diferenciada o la célula progenitora aislada no diferenciada para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha célula estimulada con luz se cultiva in vitro en una condición que permite que dicha célula se diferencie o prolifere.
- 15 3. La célula madre aislada no diferenciada o la célula progenitora aislada no diferenciada para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha estimulación con luz se realiza con una luz que tiene una longitud de onda de 400-1200 nm, una densidad de potencia de 0.5-150 mW/cm², y una dosificación de luz total de 0,01-10 J.
- 20 4. La célula madre aislada no diferenciada o la célula progenitora aislada no diferenciada para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicha estimulación con luz se realiza con una luz que tiene una longitud de onda de aproximadamente 750-1000 nm, una densidad de potencia de 0.1-200 mW/cm². y una dosificación de luz total de 0,2-10 J.
- 25 5. La célula madre aislada no diferenciada o la célula progenitora aislada no diferenciada para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, donde dicha estimulación con luz se realiza con una luz que tiene una longitud de onda de aproximadamente 810 nm, una densidad de potencia de aproximadamente 1 mW/cm², aproximadamente 50 mW/cm² o aproximadamente 100 mW/cm², y una dosis de luz total de aproximadamente 0.02 J.
- 30 6. La célula madre aislada no diferenciada o la célula progenitora aislada no diferenciada para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha célula madre o célula progenitora se selecciona del grupo que consiste en una célula progenitora neural, una célula estromal de médula ósea, una célula madre mesenquimal, una célula madre mesenquimal de médula ósea, una célula madre mesenquimal placentaria, una célula madre mesenquimal derivada de sangre periférica, una célula madre olfativa derivada, una célula madre grasa derivada, un precursor y célula madre endotelial, una célula madre dérmica del folículo piloso, una célula madre y una progenitora residente del tronco cardíaco y una célula progenitora y una célula madre/progenitora del hígado fetal.
- 35 7. La célula madre aislada no diferenciada o la célula progenitora aislada no diferenciada para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que dicha célula progenitora comprende una célula progenitora neural humana normal.
- 40 8. La célula madre aislada no diferenciada o la célula progenitora aislada no diferenciada para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha enfermedad o afección se selecciona del grupo que consiste en una lesión del sistema nervioso central (SNC), una lesión del sistema nervioso periférico (SNP), una enfermedad neurodegenerativa, diabetes y una enfermedad cardíaca.
9. La célula madre aislada no diferenciada o la célula progenitora aislada no diferenciada para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que dicha lesión del SNC o lesión del SNP es lesión de médula espinal, apoplejía o lesión cerebral traumática, en la que dicha enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple y ALS o en la que dicha enfermedad cardíaca es un infarto agudo de miocardio.
10. La célula madre aislada no diferenciada o la célula progenitora aislada no diferenciada para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho sujeto es un mamífero.

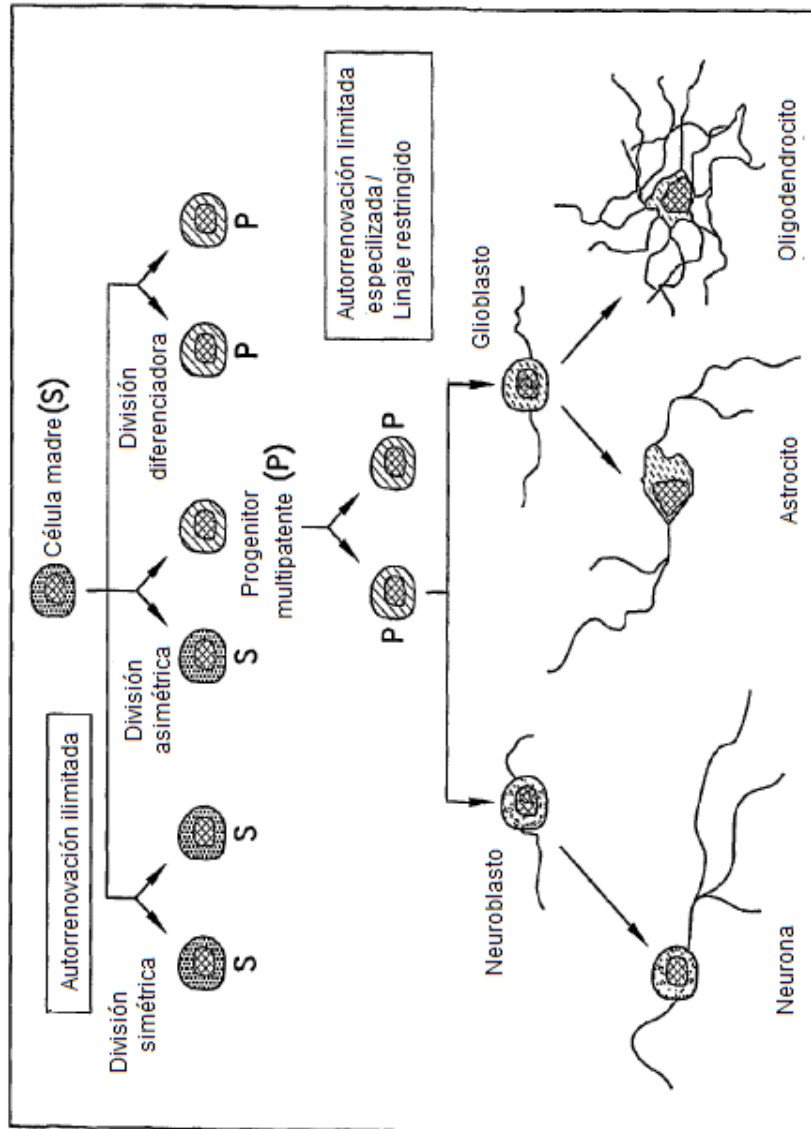


FIG.1

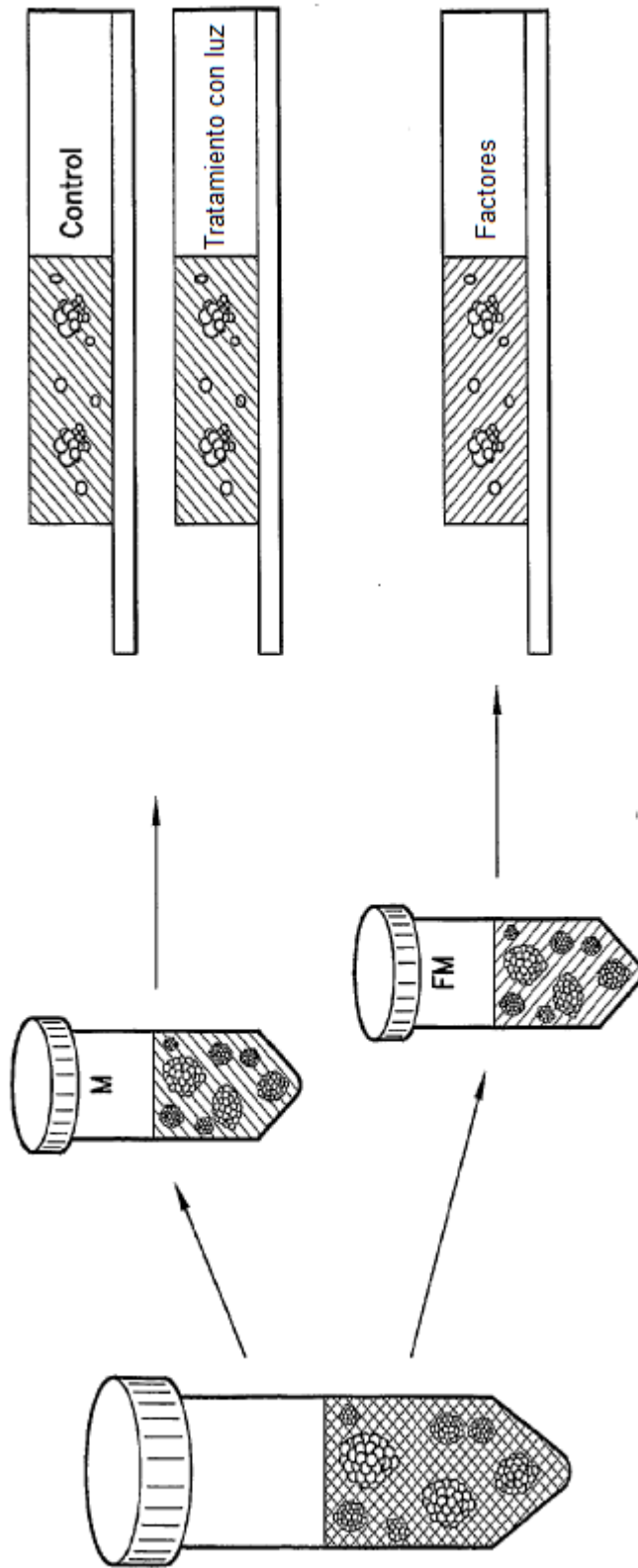
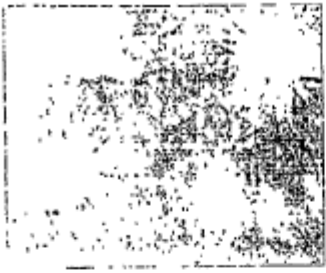
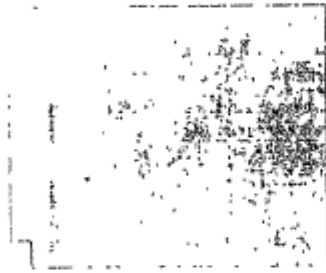


FIG.2



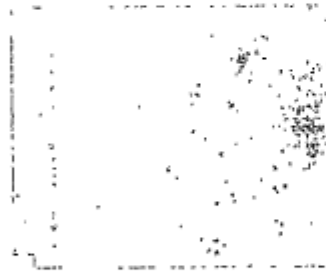
810nm luz

FIG.3D



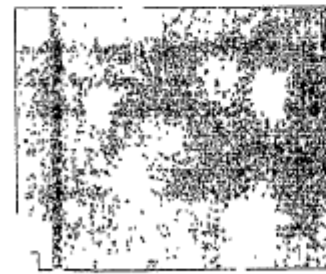
515nm luz

FIG.3C



Factoros

FIG.3B



Control

FIG.3A

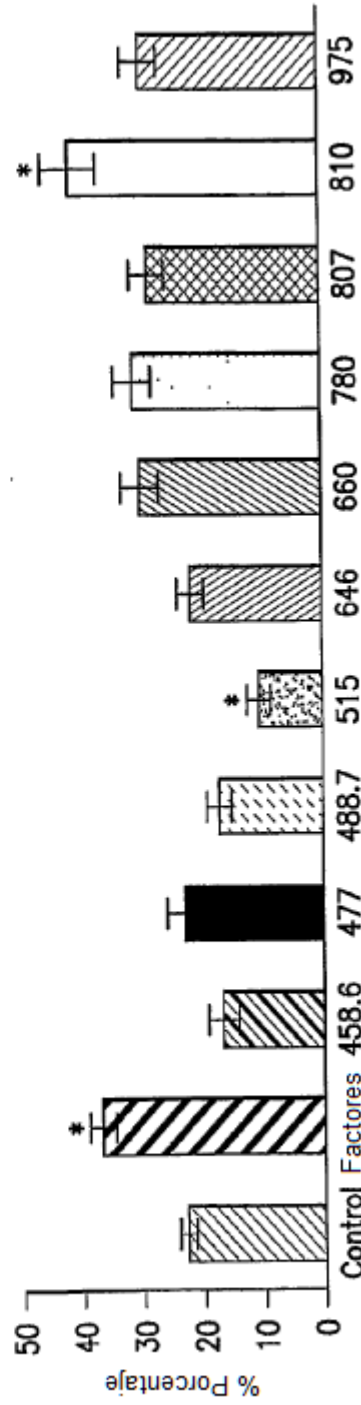


FIG.3E

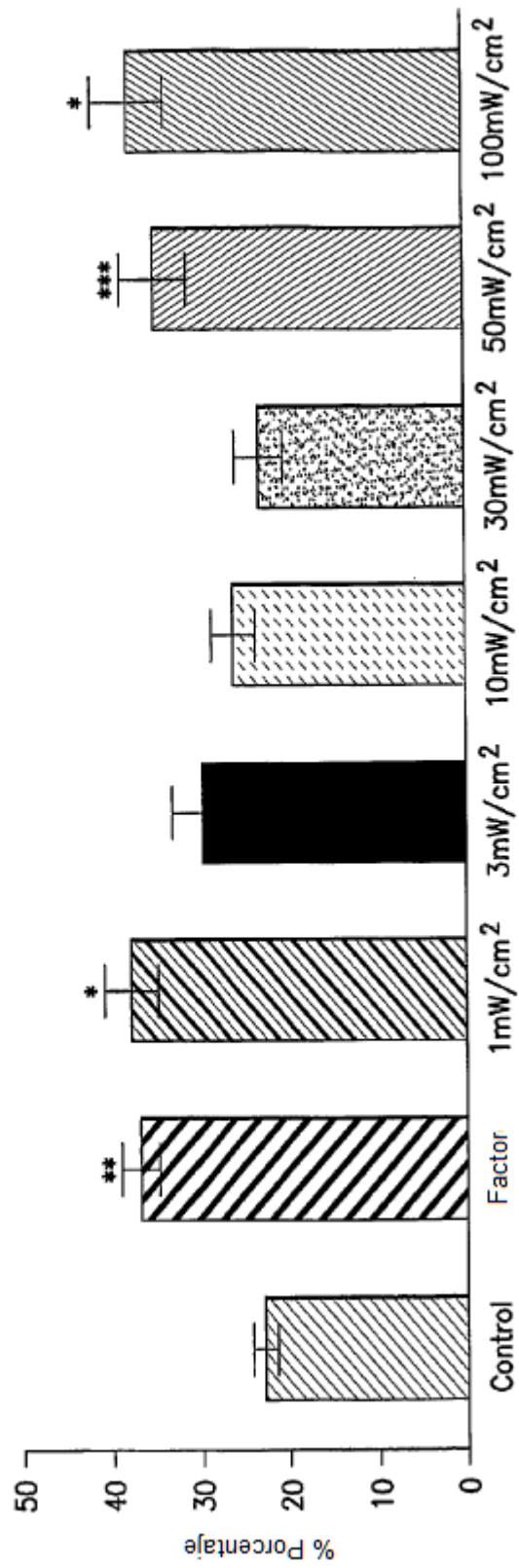


FIG.4

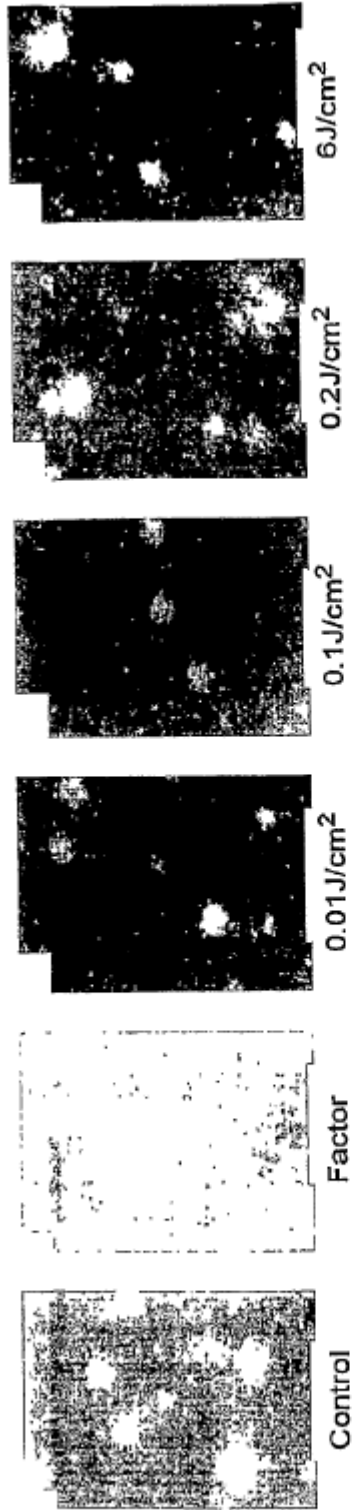


FIG.5A FIG.5B FIG.5C FIG.5D FIG.5E FIG.5F

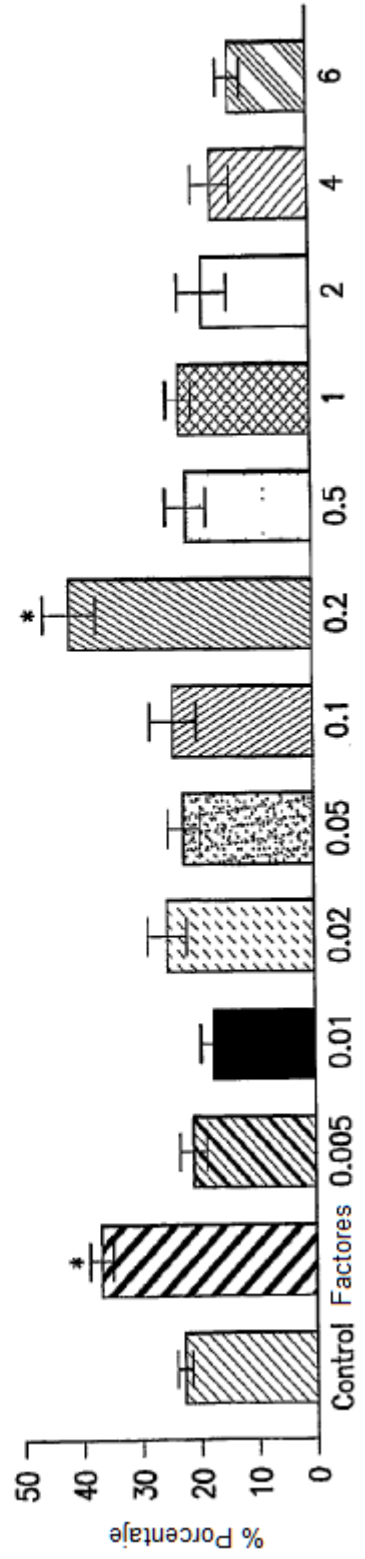


FIG.5G

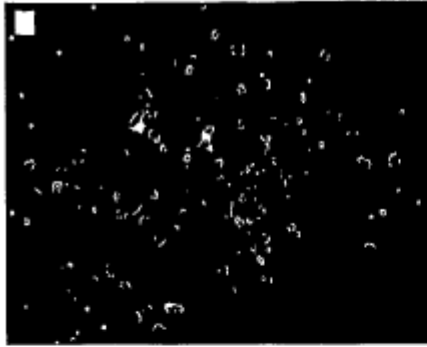


FIG.6A



FIG.6B

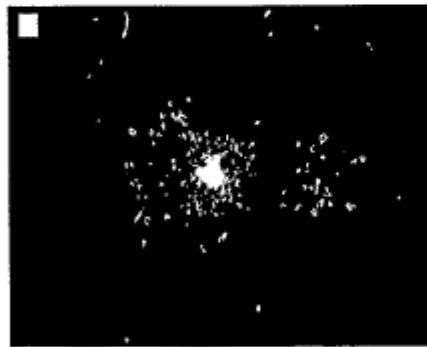


FIG.6C

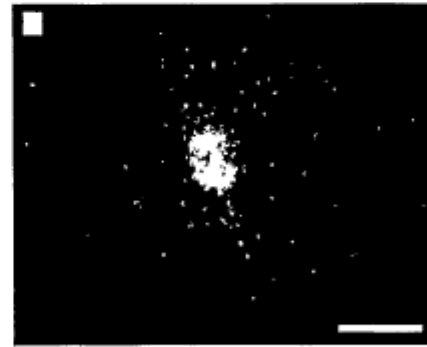


FIG.6D

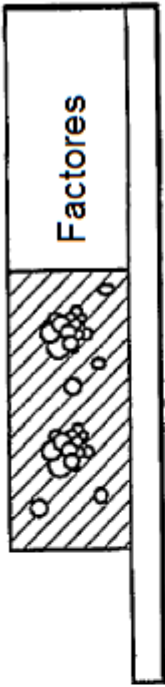


FIG.7B

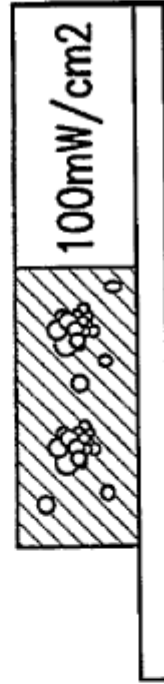


FIG.7D

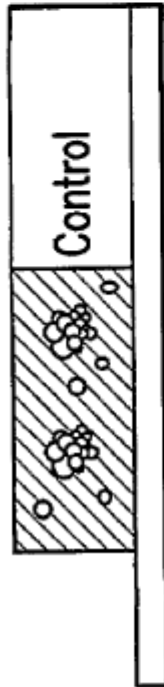


FIG.7A

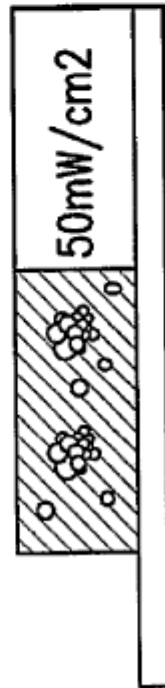


FIG.7C

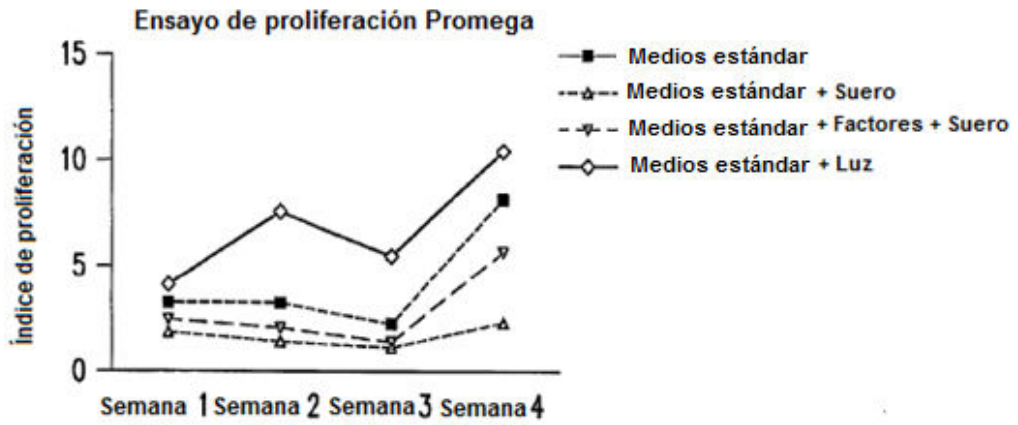


FIG.8A

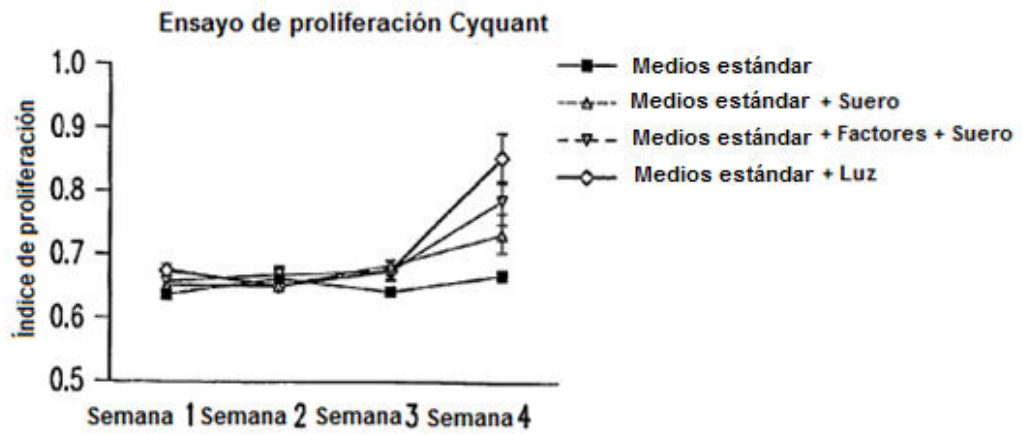


FIG.8B



FIG.9C



FIG.9B



FIG.9A



FIG.9E



FIG.9D

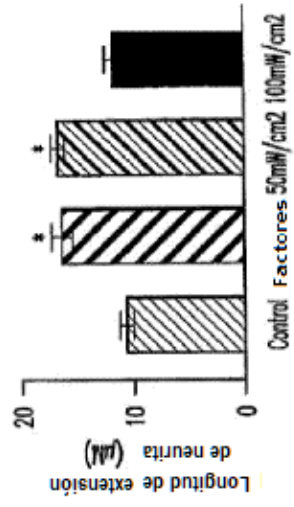


FIG.9F

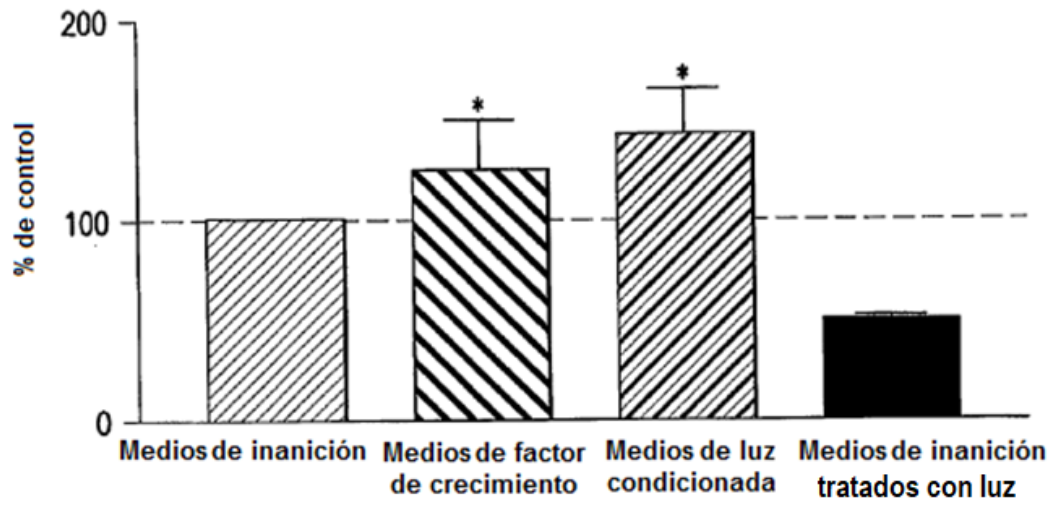


FIG.10

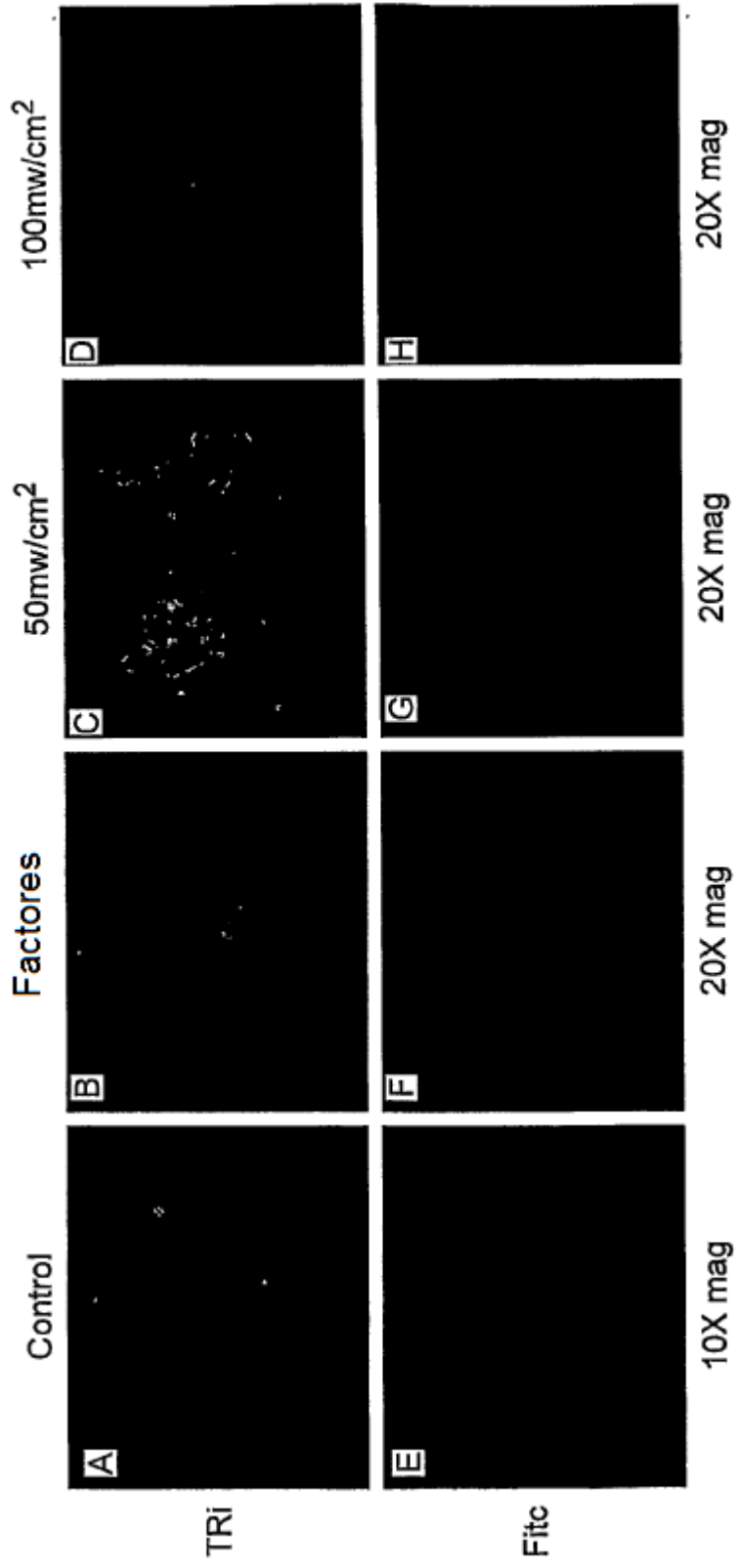


FIG.11

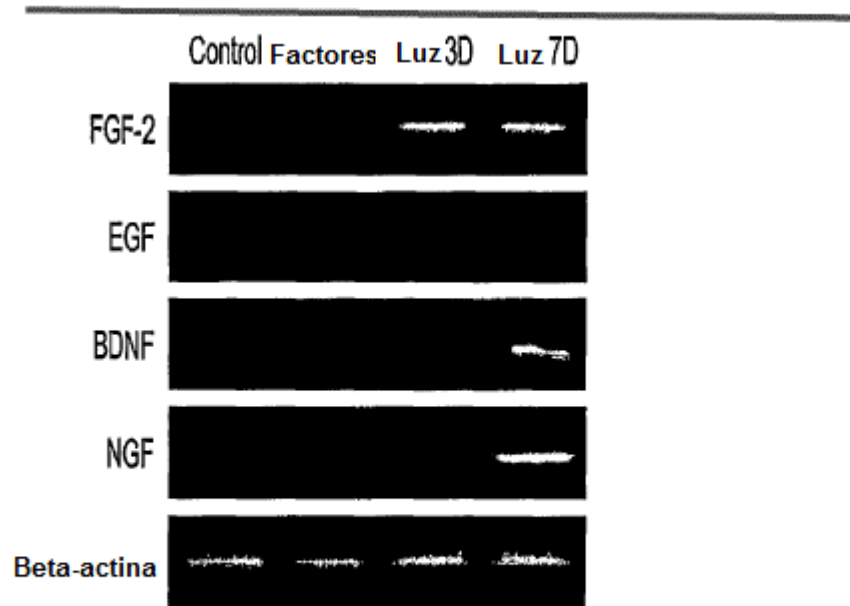


FIG.12A

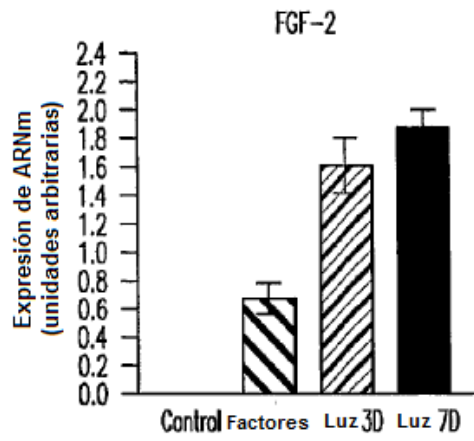


FIG.12B

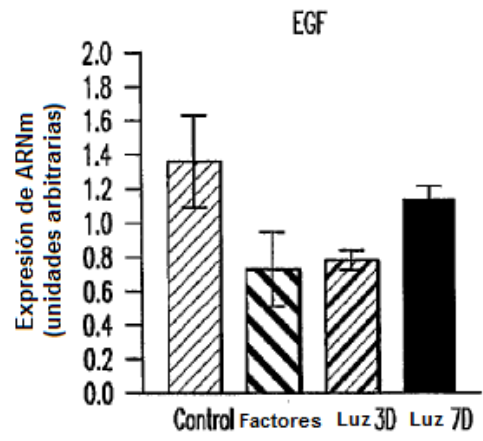


FIG.12C

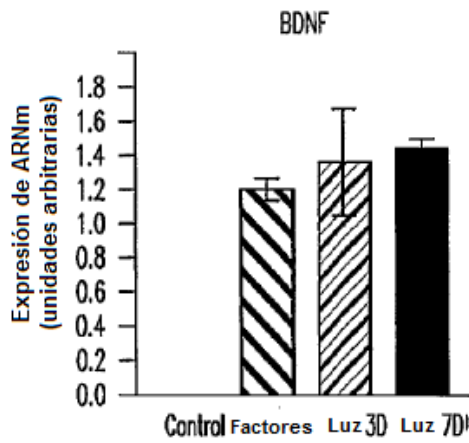


FIG.12D

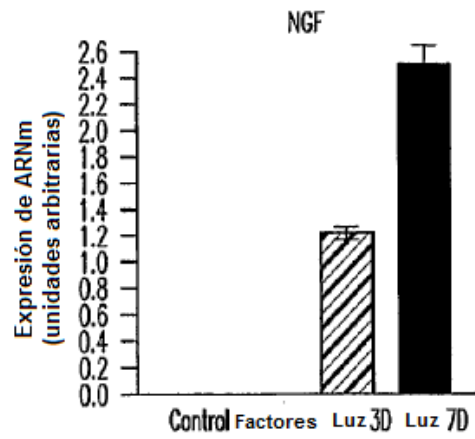


FIG.12E

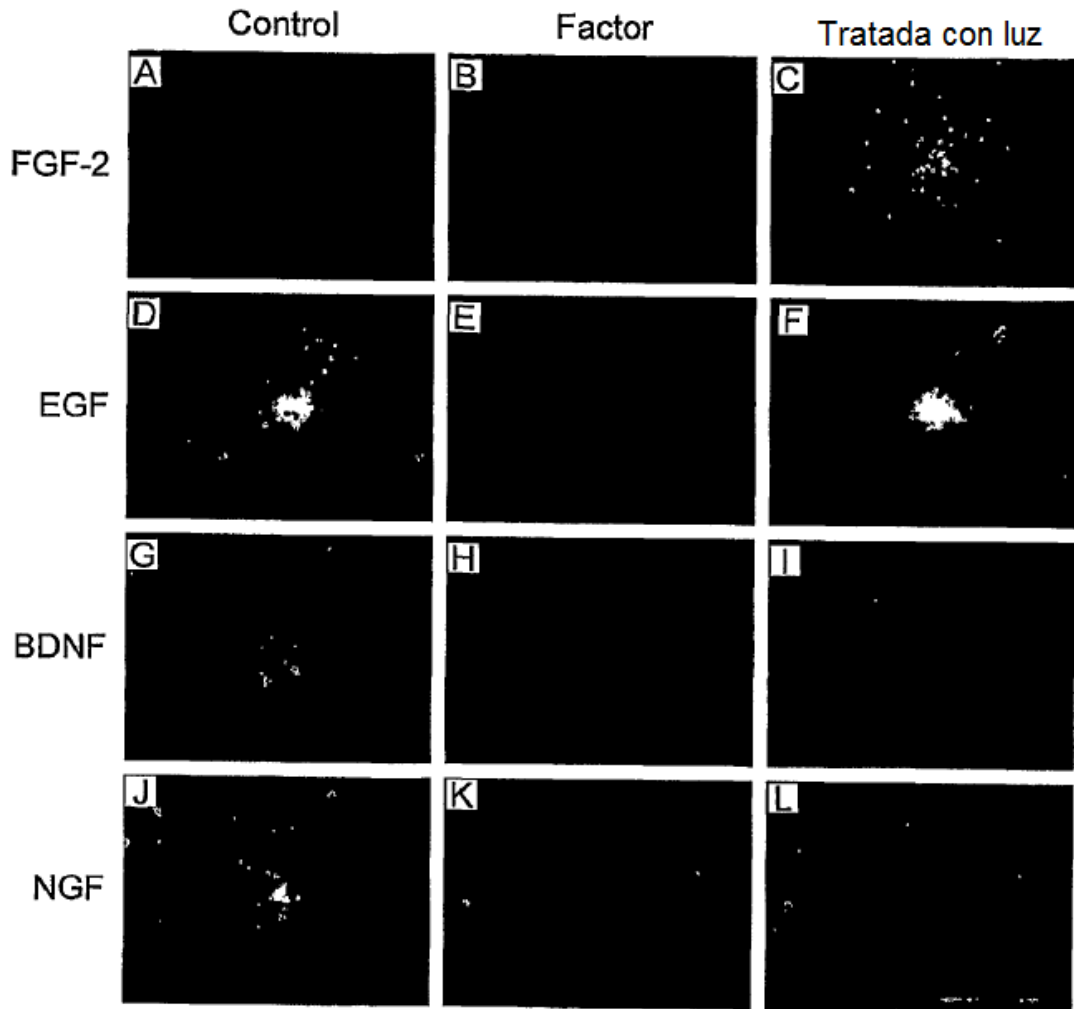


FIG.13

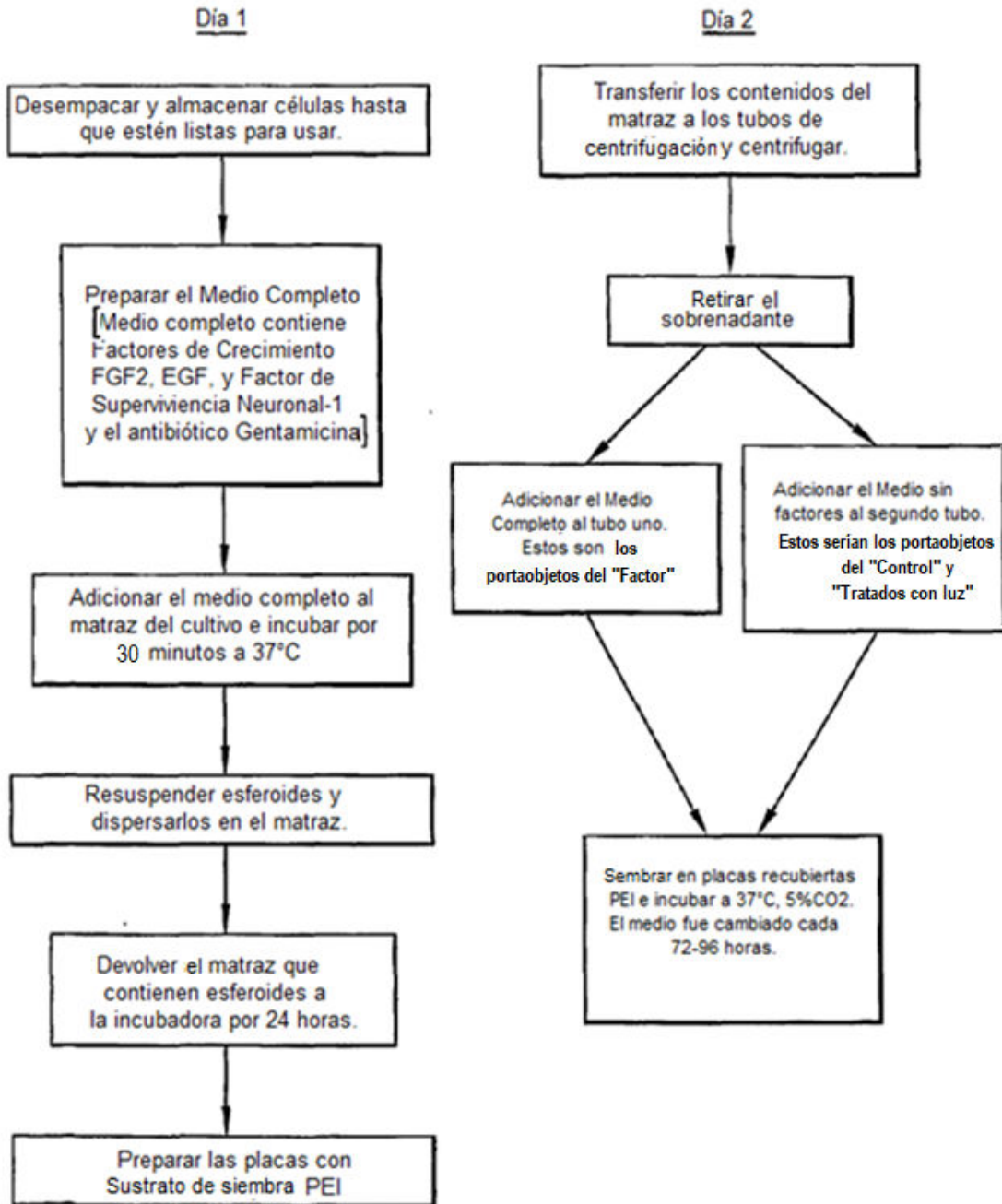


FIG.14